

**Inverse Lecithin-Spaghettimizellen als Arzneistoffträger: Eine  
physiko-chemische Charakterisierung durch diffuse  
Röntgenkleinwinkelstreuung**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität  
Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
**Dissertation**

von  
**Stefan Mackeben**  
aus Bremen

1. Referent: Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann

2. Referent: Prof. Dr. C. Führer

eingereicht am: 24. Februar 2003

mündliche Prüfung am : 6. Mai 2003

2003



Für Eva



## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Frau Prof. Dr. Müller-Goymann, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

**Mackeben, S. and C.C. Müller-Goymann:** Solubilization of timolol maleate in reversed micellar systems. Measurement of particle size using SAXS and PCS, Int. J. Pharm. 196(2000):207–210.

**Mackeben, S., M. Müller and C.C. Müller-Goymann:** The influence of water on phase transitions of a drug-loaded reverse micellar solution into lamellar liquid crystals, Colloid Surface A 183-185(2001):699–713.

### **Tagungsbeiträge**

**Mackeben, S. and C.C. Müller-Goymann:** Solubilization of Timolol Maleate in Reversed Micellar Systems : Measurement of Particle Size Using SAXS and PCS (Poster), Colloidal Drug Carriers – cdc: 4th Expert Meeting Berlin, June 3-5, 1999.

**Mackeben, S. and C.C. Müller-Goymann:** Preparing and Storing Reverse Micellar Solutions Loaded with Timolol Maleate : A Study, (Poster), Proc. 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin, 3/6 April 2000.

**Mackeben, S., M. Müller and C.C. Müller-Goymann:** The Influence of Water on a Reverse Micellar Drug Formulation: Investigation of the Physicochemical Properties, (Poster), Special Symposium „Surfactants and water soluble polymers in the bulk phase and at interfaces“, August 31 – September 2, 2000, Bayreuth.

**Mackeben, S. and C.C. Müller-Goymann:** Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) als Technik zur Charakterisierung verschiedener Arzneiformen, (Vortrag), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 10.-13. Oktober 2001, Halle/Saale.

**Mackeben, S. and C.C. Müller-Goymann:** Interactions of Ophthalmic Drugs with Lecithin Reverse Micellar Solutions: Physico-chemical Characterization, (Poster), Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APV/APGI, Florence, 8/11 April 2002.



## Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina in Braunschweig.

Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann danke ich für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis, die Zuweisung des Themas, die persönliche Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. C. Führer danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitskreise von Frau Prof. Müller-Goymann und Herrn Prof. Daniels danke ich sehr für die freundliche Arbeitsatmosphäre, umfangreiche Fachdiskussionen und die Bereitschaft, einen Physiker in die Welt der Pharmazie zu begleiten.

Den technischen Mitarbeitern danke ich für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei meinen umfangreichen Messreihen.

Dem Institut für Botanik der TU Braunschweig danke ich für die Möglichkeit, am Transmissionselektronenmikroskop zu arbeiten.

Dem Institut für Anorganische und Allgemeine Chemie danke ich für die praktische Durchführung meiner NMR-Messungen.

Herrn Dr. Burmeister und Herrn Thorsten Kroker vom Institut für Pharmazeutische Chemie danke ich für die Möglichkeit, mit FTIR-Spektroskopie arbeiten zu können sowie für die Hilfestellung bei den Messungen.

Herrn Dr. Lutz Preu vom Institut für Pharmazeutische Chemie danke ich für die Einführung in die Molecular Modelling-Berechnungen.

Abschließend danke ich vor allem denen, die mir die schwierige Anfangszeit in Braunschweig erleichterten (Spieleabende, Radtouren etc.).

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung und Problemstellung</b>                           | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Assoziat aus amphiphilen Molekülen</b>                       | <b>3</b>  |
| 2.1      | Grundlegendes . . . . .   | 3         |
| 2.2      | Invers mizellare Lösungen . . . . .                             | 9         |
| 2.2.1    | Allgemeines über inverse Mizellen . . . . .                     | 9         |
| 2.2.2    | Inverse Mizellen anionischer Tenside . . . . .                  | 10        |
| 2.2.3    | Inverse Mizellen kationischer Tenside . . . . .                 | 13        |
| 2.2.4    | Inverse Mizellen nichtionischer Tenside . . . . .               | 13        |
| 2.2.5    | Die lecithinhaltige invers mizellare Lösung . . . . .           | 15        |
| 2.3      | Die invers mizellare Lösung als Drug Delivery System . . . . .  | 23        |
| 2.3.1    | Prinzip des Drug Delivery Systems . . . . .                     | 25        |
| 2.3.2    | Lamellare Flüssigkristalle . . . . .                            | 25        |
| 2.3.3    | Solubilisierete Arzneistoffe . . . . .                          | 28        |
| <b>3</b> | <b>Experimentelle Methoden</b>                                  | <b>32</b> |
| 3.1      | Materialien . . . . .   | 32        |
| 3.2      | Methodik : Herstellung der IML-Stammlösung . . . . .            | 34        |
| 3.3      | Verwendete Methoden und Geräte . . . . .                        | 36        |
| 3.3.1    | Röntgenstrukturanalyse . . . . .                                | 36        |
| 3.3.1.1  | Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) . . . . .                     | 36        |
| 3.3.1.2  | Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) . . . . .                      | 37        |
| 3.3.2    | Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) . . . . .               | 37        |
| 3.3.3    | Thermogravimetrie . . . . .                                     | 40        |
| 3.3.4    | Karl-Fischer-Titration (Bestimmung des Wassergehalts) . . . . . | 40        |
| 3.3.5    | Spektroskopische Methoden . . . . .                             | 40        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3.5.1  | $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .                                       | 40        |
| 3.3.5.2  | Infrarot-Spektroskopie (FTIR) . . . . .  | 42        |
| 3.3.6    | Mikroskopische Methoden . . . . .  | 43        |
| 3.3.6.1  | Polarisationsmikroskopie . . . . .   | 43        |
| 3.3.6.2  | Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) . . . . .                                | 43        |
| 3.3.7    | Molecular Modelling . . . . .  | 44        |
| <b>4</b> | <b>Röntgenkleinwinkelstreuung</b>  | <b>45</b> |
| 4.1      | Grundlagen der Röntgenkleinwinkelstreuung . . . . .                                | 45        |
| 4.1.1    | Das Prinzip der Röntgenkleinwinkelstreuung . . . . .                               | 46        |
| 4.1.2    | Streukurve und Elektronenabstandsverteilung . . . . .                              | 47        |
| 4.2      | Kalibrierung der Kratky-Kamera mit SDS-Mizellen . . . . .                          | 48        |
| 4.2.1    | Aufbau der Kratky-Kamera . . . . .   | 49        |
| 4.2.2    | Justierung der Kamera . . . . .  | 50        |
| 4.2.3    | Messung an Na-Dodecylsulfat (SDS)-Mizellen . . . . .                               | 51        |
| 4.2.4    | Bearbeitung der Streukurven . . . . .  | 53        |
| 4.2.5    | Auswertung der Streukurven mit ITP-92 . . . . .                                    | 58        |
| 4.2.6    | Die Elektronenabstandsfunktion $p(r)$ . . . . .                                    | 61        |
| 4.2.7    | Bestimmung des Elektronendichteprofiles . . . . .                                  | 62        |
| 4.3      | Messung zylindrischer Streuobjekte . . . . .                                       | 64        |
| 4.4      | Der Streumassenradius nach Guinier . . . . .                                       | 66        |
| 4.5      | Messung lamellarer Systeme . . . . .   | 70        |
| 4.6      | Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) . . . . .   | 71        |
| <b>5</b> | <b>Experimentelle Resultate</b>  | <b>74</b> |
| 5.1      | Durchführung der Messreihen . . . . .  | 74        |
| 5.1.1    | Makroskopische Veränderungen der Systeme . . . . .                                 | 75        |
| 5.1.2    | Thermogravimetrische Untersuchung des Messvorgangs . . . . .                       | 78        |
| 5.1.3    | Abhängigkeit der Mizellgröße von der Probenpräparation . . . . .                   | 82        |
| 5.2      | Untersuchung der flüssigkristallinen Phase . . . . .                               | 83        |
| 5.2.1    | Einfluss der Arzneistoffkonzentration auf den lamellaren Flüssigkristall . . . . . | 83        |
| 5.2.1.1  | Polarisationsmikroskopische Untersuchungen . . . . .                               | 83        |
| 5.2.1.2  | Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) . . . . .   | 84        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 5.2.2    | Einfluss verschiedener Arzneistoffmoleküle auf die Mesophase . . . . .      | 88         |
| 5.2.2.1  | Polarisationsmikroskopische Untersuchungen . . . . .                        | 88         |
| 5.2.2.2  | Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) . . . . .                                  | 92         |
| 5.2.3    | Elektronenmikroskopische Aufnahmen . . . . .                                | 100        |
| 5.3      | Untersuchung der invers mizellaren Systeme . . . . .                        | 101        |
| 5.3.1    | Photonenkorrelationsspektroskopie . . . . .                                 | 102        |
| 5.3.2    | Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) . . . . .                                 | 105        |
| 5.3.3    | Betrachtung des mizellaren Querschnitts . . . . .                           | 112        |
| 5.3.4    | SAXS an Systemen mit variabler Arzneistoffkonzentration . . . . .           | 120        |
| 5.4      | Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Lecithin und Arzneistoff . . . . . | 131        |
| 5.4.1    | Kernresonanzspektroskopie ( $^{31}\text{P}$ -NMR) . . . . .                 | 131        |
| 5.4.2    | Infrarot-Spektroskopie (FTIR) . . . . .                                     | 136        |
| <b>6</b> | <b>Modellvorschläge und Abschlussdiskussion</b>                             | <b>142</b> |
| 6.1      | Molecular Modelling . . . . .   | 142        |
| 6.2      | Modelle zur Assoziation der Lecithinmoleküle . . . . .                      | 143        |
| 6.3      | Modelle zum Einbau der Arzneistoffe . . . . .                               | 147        |
| 6.3.1    | Einbau von Diclofenac-Natrium . . . . .                                     | 147        |
| 6.3.2    | Einbau von Timolol-Hydrogenmaleat . . . . .                                 | 150        |
| 6.3.3    | Einbau von Pilocarpin-HCl . . . . .   | 154        |
| 6.4      | Fazit . . . . .   | 157        |
| <b>7</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>159</b> |



# Kapitel 1

## Einleitung und Problemstellung

In ihrem 1988 publizierten Artikel „*Organogels from Lecithins*“ beschrieben Scartazzini und Luisi, dass invers mizellare Lösungen aus Lecithinen und apolaren lipophilen Lösungsmitteln unter geringer Wasserzugabe hochviskose Systeme bilden [1]. Aufgrund der Biokompatibilität der Inhaltsstoffe diskutierten die Autoren eine mögliche pharmazeutische bzw. medizinische Anwendung.

Die hohe Viskosität dieser Systeme ist Folge eines Wachstums inverser Mizellen zu langen, flexiblen zylindrischen Assoziaten [2], die sich in einem ungeordneten, verknäuelten Zustand befinden. Wegen der fehlenden Gerüststruktur sind die in dieser Arbeit als *Spaghettimizellen* bezeichneten Systeme streng genommen keine Gele, sondern hochviskose Sole [3].

Die Eignung der Spaghettimizellen als Arzneistoffträger konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Bei dermalen Applikation eignen sich die Spaghettimizellen als Penetrationenhancer [4–7]. Besteht dagegen Kontakt zu einem wässrigen Medium, so kommt es zur Ausbildung lamellarer Flüssigkristalle, aus denen die Freisetzungsrates gegenüber einer wässrigen Lösung deutlich verzögert ist [8, 9].

Eine Anwendung der Spaghettimizellen als ophthalmologische Retardformulierung bietet sich an, da es hier zum Kontakt mit der wässrigen Tränenflüssigkeit und damit zur Ausbildung eines Drug Delivery Systems mit kontrollierter Freisetzung kommt [10]. Das Auge wird durch Formulierungen mit geeigneten Lösungsmitteln nicht gereizt [11, 12]. Wegen der niedrigeren Applikationsfrequenz werden viskose ophthalmologische Systeme von Patienten gegenüber wässrigen Augentropfen bevorzugt [13]. Zudem erhöht sich bei Benutzung viskoser Systeme die Kontaktzeit zwischen Arzneistoff und Auge, was zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit führt [14].

Wesentlich für das Verständnis des Retardprinzips sind die Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffträger und Arzneistoff. Der Einfluss von Arzneistoffen auf Viskosität und Struktur ternärer Systeme aus Lecithin, Isopropylmyristat und Wasser war bereits mehrfach Gegenstand von Untersuchungen [3, 15–18].

Durch die Solubilisierung von Arzneistoffen werden Veränderungen im Aufbau der Spaghettimizellen erwartet, die sich in einem verzögerten bzw. beschleunigten Wachstum oder in Veränderungen im mizellaren Querschnitt niederschlagen können. Die Ausbildung der Drug Delivery Systeme erfolgt durch Kontakt mit Wasser. Der solubilisierter Arzneistoff wirkt sich auf die Struktur der hier entstehenden Mesophasen aus.

Das Ziel der Arbeit besteht darin, diese eben beschriebenen Veränderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften der Systeme zu charakterisieren. Als Methode zur Ermittlung dieser Eigenschaften wird in erster Linie die Röntgenkleinwinkelstreuung genutzt. Ergänzt wird die Methode durch spektroskopische Messungen zur Ermittlung der Bindungen zwischen der Trägersubstanz Lecithin und den Arzneistoffen.

Um auf bereits existierenden Resultaten aufbauen zu können, dient eine invers mizellare Lösung aus 30% Lecithin in Isopropylmyristat als Trägersystem, während als Modellarzneistoffe die ophthalmologisch anwendbaren Arzneistoffe Pilocarpin-HCl, Timolol-Hydrogenmaleat und Diclofenac-Natrium eingesetzt werden.

Anhand der Resultate erfolgt eine Postulierung von Modellen zum Einbau dieser Arzneistoffe in die inversen Spaghettimizellen.

# Kapitel 2

## Assoziat aus amphiphilen Molekülen

In diesem Teil der Arbeit soll ein umfassender Überblick über die verwendeten Systeme gegeben werden. Der erste Abschnitt befasst sich mit den invers mizellaren Lösungen, die im folgenden mit *IML* abgekürzt sind. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf lecithinhaltige IML gelegt, deren Charakterisierung Thema dieser Arbeit ist.

Beim Einsatz invers mizellarer Systeme als Arzneistoffträger kommt es zum Kontakt mit wässrigen Umgebungsmedien [3, 8, 9]. Vorliegende Erkenntnisse über die Eignung lecithinhaltiger IML als Arzneistoffträger sind ebenso wie die lyotropen lamellaren Flüssigkristalle, die unter Kontakt von Wasser mit den IML entstehen, Gegenstand des zweiten Abschnitts dieses Kapitels.

### 2.1 Grundlegendes

Amphiphile Moleküle (auch als *Tenside* oder *Emulgatoren* bezeichnet) bestehen allgemein aus einer polaren Kopfgruppe und einem apolaren Rest (s. Abb. 2.1).

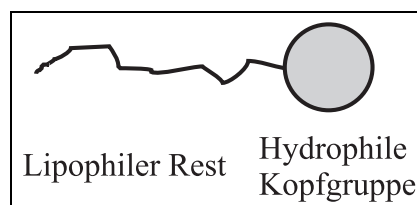


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines amphiphilen Moleküls. Der lipophile Rest kann aus einer (z.B. Natrium-Dodecylsulfat) oder zwei Kohlenwasserstoffketten (z.B. Phosphatidylcholin) bestehen.

Löst man solche Moleküle in wässrigen Lösungsmitteln, so liegen diese nicht monomer in Lösung vor, sondern lagern sich zunächst in Phasengrenzflächen an und bilden in höheren Konzentrationen Assoziat, die als Mizellen bezeichnet werden. Der Grund für dieses

Verhalten ist das Erreichen des thermodynamisch günstigsten Zustands, der durch ein Minimum der freien Enthalpie  $G$  gegeben ist. Eine Assoziation von amphiphilen Molekülen zu Mizellen findet statt, wenn die durch die Gibbs-Helmholtz-Gleichung gegebene freie Bildungsenthalpie  $\Delta G$  negativ ist.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

Da die Bildungsenthalpie  $\Delta H$  der Mizellbildung häufig positiv ist [19], muss die Bildungsentropie  $\Delta S$  ebenfalls positiv sein, was durch die Auflösung von Solvathüllen wie z.B. Clathratkäfigen um die hydrophoben Molekülteile zu erklären ist. Die Entropiezunahme bei der Zusammenlagerung der apolaren Gruppen eines Moleküls ist als *hydrophobe Wechselwirkung* bekannt [19, 20] und für die Mizellisation primär verantwortlich. Der Vorgang der Mizellbildung findet nur oberhalb einer definierten, systemabhängigen Tensidkonzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) statt. Auch die Temperatur spielt für die Mizellbildung eine entscheidende Rolle. So ist eine Assoziation zu Mizellen nur oberhalb der als *Krafft-Temperatur* bekannten Grenztemperatur zu beobachten [19].

Die Existenz von Mizellen in wässrigen Medien ist seit etwa 1910 bekannt [21]. Seitdem wurden mehrere Modelle postuliert (Abb. 2.2), aus denen sich das Tröpfchen-Modell (Abb. 2.2b), das auch in dieser Arbeit für die Struktur der SDS-Mizellen zugrunde gelegt wird, in der Literatur durchgesetzt hat.

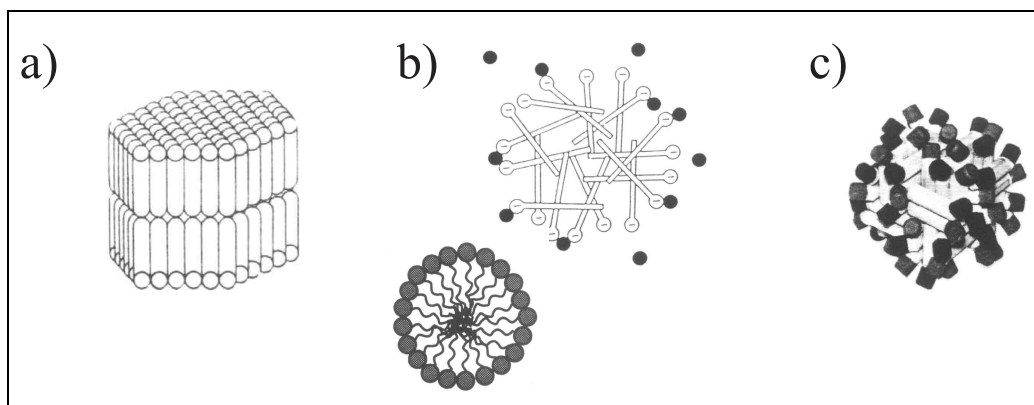


Abbildung 2.2: Modelle wässriger Mizellen (a) Bilayer-Modell ; (b) Tröpfchen-Modell nach Hartley (aus: [21], unten: Schema des Tröpfchenmodells); (c) Modell nach Fromherz [22].

In apolaren Lösungsmitteln kann ebenfalls eine Assoziatbildung stattfinden, die erstmals um 1942 von Schulman und Hoar nachgewiesen wurde [23]. Die hydrophilen Teile des Amphiphils bilden bei diesem Vorgang einen Kern im Innern des Assoziats, während die lipophilen Gruppen nach außen ins unpolare Lösungsmittel gerichtet sind. Wegen dieser

Struktur gaben Schulman und Hoar diesen Assoziaten in Analogie zu gewöhnlichen Mizellen den Namen *inverse Mizellen* [23].

Die Assoziation von Tensidmolekülen in lipophilen Lösungsmitteln stellt sich im Gegensatz zur Mizellbildung in wässrigen Medien als ein kontinuierlicher Prozess heraus. Eine scharfe CMC ist hier nicht vorhanden. Vielmehr findet eine Assoziation zu Dimeren und Oligomeren schon bei vergleichsweise sehr geringen Tensidkonzentrationen statt [24, 25]. Die Angabe einer kritischen Mizellbildungskonzentration ist deshalb nur mit einer ausführlichen Interpretation sinnvoll und immer im Kontext mit dem zugehörigen Messverfahren zu verstehen. Aus diesen Gründen sehen manche Autoren eine CMC für inverse Mizellen als nicht existent an [26]. Ein kontinuierliches Aggregationsverhalten lässt eine hohe Polydispersität invers mizellarer Assoziate wahrscheinlich erscheinen. Dieser als *stepwise association* oder *multi-equilibrium model* bezeichnete Prozess ist nach Muller auf invers mizellare Systeme anwendbar [27], während Hamley dieses Modell der Assoziation wegen der fehlenden CMC als generell unzutreffend ansieht [28]. Die Mizellbildung wird nach Muller mit *closed association* bezeichnet, wenn die Aggregationszahl nach oben begrenzt ist; anderenfalls spricht man von *open association* [27].

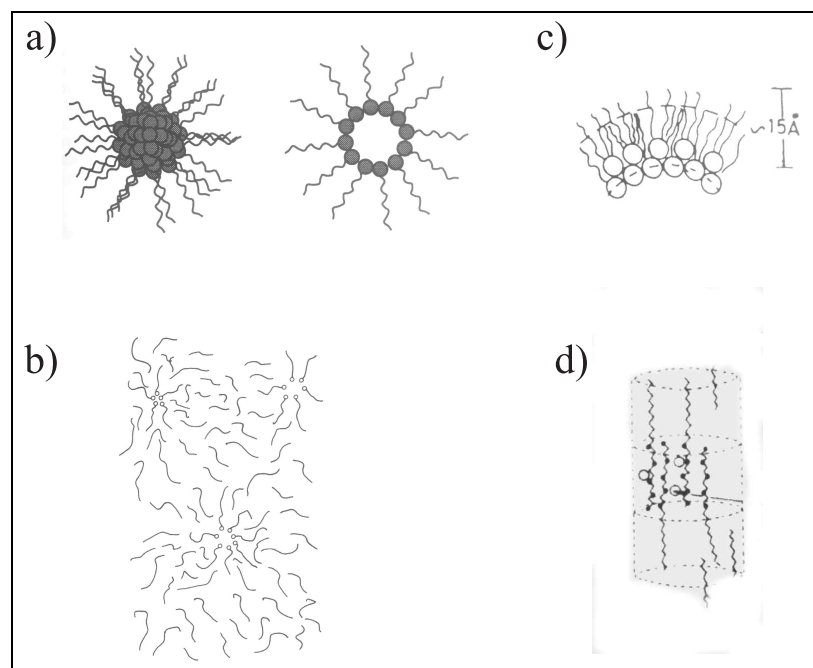


Abbildung 2.3: Modelle inverser Mizellen (a) starres Modell ; (b) Modell ohne scharfe Grenzfläche aus: [29] und (c) nach Maitra [30]; (d) Strang-ähnliche *hank-like aggregates* nach Ravey et al. [26].

Die Strukturmodelle inverser Mizellen gehen meist von einem starren Modell analog

einer wässrigen Mizelle aus, obwohl keine scharfe Grenzfläche zwischen Assoziat und Umgebungsmedium zu erwarten ist [30, 31]. Abb 2.3 zeigt Modelle inverser Mizellen. Für die Art der Mizellbildung ohne scharfe Grenzen spricht auch die relativ kurze Aufenthaltszeit eines Moleküls in einer inversen Mizelle, die für Blockpolymer-Mizellen in der Größenordnung von Millisekunden liegt [32]. Die kurze Aufenthaltszeit ist dabei nicht als Lebensdauer der Mizelle zu verstehen – in diesem Fall wären Messungen der Diffusion wie bei der Photonenkorrelationsspektroskopie nicht möglich – sondern als dynamisches Gleichgewicht zwischen Mizellaggregat und Monomer. Im Rahmen dieser Arbeit wird von dem am weitesten verbreiteten Modell – dem starren Modell der inversen Mizelle – ausgegangen. Für die Röntgenkleinwinkelstreuung ist die Annahme definierter Grenzen des Assoziats zur Auswertung der Streukurven erforderlich.

Die Assoziation zu inversen Mizellen ist im Gegensatz zu wässrigen Mizellen nicht ausschließlich entropiegesteuert. Pilpel betrachtete drei Ursachen zur Bildung inverser Mizellen [33]:

1. Die Verminderung der Grenzflächenenergie der Moleküle durch die Assoziation.
2. Die Änderung der Wechselwirkungspotenziale, resultierend aus der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Tensidmolekülen.
3. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den assoziierten Tensidmolekülen.

Nach Pilpel [33] reicht die Änderung der freien Bildungsenthalpie  $\Delta G$  allein aus, um die Existenz inverser Mizellassoziat bei Raumtemperatur begründen zu können. Die Entropie, die bei einer Assoziation zu inversen Mizellen abnimmt und damit der Assoziation entgegenwirkt, ist hier jedoch nicht berücksichtigt. Eicke erwähnt hingegen, dass aus seinen Messergebnissen aus IR- und NMR-Spektroskopie und osmometrischen Messungen an verschiedenen Amphiphilen in Heptan hervorgeht, dass Wasserstoffbrückenbindungen im polaren Kern der vorherrschende, wenn nicht sogar der entscheidende Effekt für die Bildung inverser Mizellen sind [34]. Inverse Mizellen können in Abhängigkeit verschiedenster Parameter völlig unterschiedliche Charakteristika sowohl in ihrer Eigenschaft als Assoziat als auch im Rahmen ihres Assoziationsprozesses zeigen. Solche Parameter sind Art und Struktur des Tensids, Lösungsmittel, Temperatur, Gegenion des Tensids, Wassergehalt und anwesende Fremdmoleküle. Verschiedene weitere Modelle wurden aufgestellt, die diese Parameter teilweise berücksichtigen [27, 35].

Eicke und Christen stellten ein Modell zur Ermittlung der Stabilität inverser Mizellen auf, das auf Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den polaren Gruppen der Tenside und auf van-der-Waals-Interaktionen zwischen den Tensid- bzw. den Lösungsmittelmolekülen beruht [36]. Die zugehörigen Berechnungen ergeben in Übereinstimmung

mit experimentellen Resultaten stabile Aggregate mit einer sehr schmalen Varianz der Aggregationszahl. Allerdings ist die Aggregation zu langen, zylindrischen Assoziaten mit diesem Modell nicht zu erklären. Da solche Mizellen jedoch existieren (z.B. Lecithin in Alkanen [37]), muss dieses Modell als unvollständig betrachtet werden.

Ein weiteres, sehr geläufiges Modell, das die Selbstassoziation amphiphiler Moleküle allgemein beschreibt, kombiniert die Thermodynamik der Selbstassoziation von Tensidmolekülen zu Mizellen oder Vesikeln mit den geometrischen Abmessungen der polaren und apolaren Gruppen der Moleküle [38, 39]. Aus diesen Modellannahmen resultiert, dass die Geometrie der Moleküle einen wesentlichen Einfluss auf die Assoziatform hat. Als Konsequenz daraus führte Israelachvili 1980 einen *Packungsparameter*  $P$  ein:

$$P = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad (2.2)$$

in dem  $v$  das Volumen des lipophilen Molekülteils,  $l_c$  die Länge des lipophilen Schwanzteils und  $a_0$  den Platzbedarf der hydrophilen Kopfgruppe des Tensids in der Grenzfläche hydrophil–lipophil darstellt [40]. Der Packungsparameter beschreibt anschaulich das Verhältnis des Raumbedarfs der lipophilen Molekülteile zum Raumbedarf der hydrophilen Gruppen. Die thermodynamisch günstigste Struktur ist durch ein Zusammenspiel des Packungsparameters mit der Entropie des Systems, die kleinere Assoziate favorisiert, festgelegt [40]. Abb. 2.4 verdeutlicht diesen Effekt am Beispiel einer stäbchenförmigen Mizelle. Diese Form wird ebenso wie die Formung von Vesikeln wie z.B. Liposomen aus flachen Bilayern wegen der Vermeidung der energetisch ungünstigen Ränder der Bilayer bzw. Stäbchenmizellen bevorzugt [38].

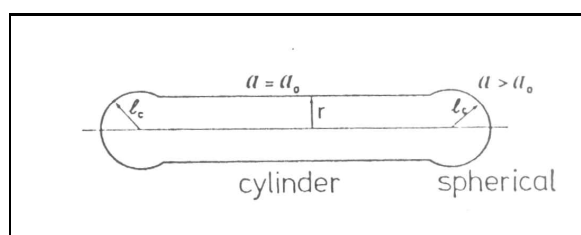


Abbildung 2.4: Stäbchenförmige Mizelle. Die abgerundeten Enden der Mizelle weisen eine andere Packungsform auf als der Innenteil. Aus [39].

Die Auswirkung des Packungsparameters auf die Vesikelform ist in Abb. 2.5 dargestellt. Das Modell des Packungsparameters ist universell auf Assoziate amphiphiler Moleküle anwendbar. Inverse Mizellen bilden sich demnach, wenn der lipophile Bereich des Tensids einen größeren Raumbedarf hat als der polare Teil. Ein Beispiel sind unhydratisierte Phospholipidmoleküle in lipophilen Lösungsmitteln, bei denen der Packungsparameter

$P > 1$  ist.






|                             |                    |  |
|-----------------------------|--------------------|--|
| Spherical micelles          | $V/al < 1/3$       |   |
| Cylindrical micelles        | $1/3 < V/al < 1/2$ |   |
| Vesicles, flexible bilayers | $1/2 < V/al < 1$   |   |
| Lamellae, planar bilayers   | $V/al \approx 1$   |   |
| Inverse micelles            | $V/al > 1$         |  |

Abbildung 2.5: Beispiele verschiedener Packungsparameter und der entsprechenden Assoziatformen. Aus [28].

Trotz der bisher erwähnten Erkenntnisse ist es bisher nicht gelungen, eine umfassende Theorie für die Bildung inverser Mizellen aufzustellen, die eine Einschätzung der physiko-chemischen Eigenschaften der Assoziat im Voraus ermöglicht. In der Literatur sind Untersuchungen physiko-chemischer Eigenschaften inverser Mizellen aus ionenaktiven Tensiden, nichtionischen Tensiden, Blockpolymeren und Lecithinen zu finden. In den nächsten Abschnitten werden die Resultate der Untersuchungen zusammengefasst und diskutiert.



## 2.2 Invers mizellare Lösungen

### 2.2.1 Allgemeines über inverse Mizellen

Die Eigenschaft invers mizellarer Systeme, Wasser in ihrem Kernbereich solubilisieren zu können, ist für diverse Zwecke von großem Interesse. Die Solubilisation hydrophiler und amphiphiler Arzneistoffe in den Kernbereich lässt sich pharmazeutisch auf zwei Arten nutzen:

- Die Entwicklung von Retardformen durch Kontakt der IML mit einem wässrigen Umgebungsmedium [7, 9, 10, 41]
- IML als Penetrations-Enhancer für schlecht permeierende Arzneistoffe [4–6]

Weitere Anwendungsgebiete sind in der Kosmetik und in der Biotechnologie zu finden. So lassen sich inverse Mizellen als Mikroreaktoren zur Synthese von Proteinderivaten, für enzymatische Reaktionen [42, 43] und zur Herstellung monodisperser hochfeiner Partikel von Metallverbindungen [44] nutzen. Die Affinität gerade der lecithinhaltigen inversen Mizellen zu Biomembranen liefert eine Möglichkeit zum Drug Targeting. Im Rahmen dieses Vorgangs können in inverse Mizellen solubilisierte Wirkstoffe durch Fusion direkt in die Membranen inkorporiert werden. Bisher ist dieses Drug Targeting allerdings hauptsächlich mit Liposomen, mit denen auch Endozytose möglich ist, mit wässrigen Blockpolymer-Mizellen [45] und lecithinhaltigen O/W-Mikroemulsionen [46] bekannt.

Durch die Solubilisation von Wasser werden die physiko-chemischen Eigenschaften inverser Mizellen stark beeinflusst. Allgemein findet eine Vergrößerung der Mizellen statt [47]; nebenbei sind auch Formänderungen wie am Beispiel einiger Lecithinassoziate möglich [48]. Die maximal aufnehmbare Menge an Wasser und der Zustand der solubilisierten Wassermoleküle ist von der Art des Tensids, von den Eigenschaften des Lösungsmittels und von möglichen Fremdmolekülen abhängig. Zur Quantifizierung des Wassergehaltes inverser Mizellen wird allgemein der  $w_0$ -Wert benutzt, der das molare Verhältnis zwischen Wasser und Tensid angibt.

$$w_0 = \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Tensid}]} \quad (2.3)$$

Alternativ kann der direkt aus der Karl-Fischer-Titration resultierende Massenanteil des Wassers angegeben werden. Die Eigenschaften des solubilisierten Wassers sind stark systemabhängig und werden in den folgenden Abschnitten gesondert behandelt. Eine „Begriffsunschärfe“, die in der Literatur über inverse Mizellen häufig auftaucht, muss an

dieser Stelle jedoch angesprochen werden. Hiernach werden invers mizellare Systeme oft als W/O-Mikroemulsionen bezeichnet. Dieser Begriff sollte sich jedoch auf solche Systeme beschränken, in denen solubilisiertes Wasser in seinen Eigenschaften denen des freien Wassers oder Bulkwassers sehr nahe kommt. Mikroemulsionssysteme zeichnen sich dadurch aus, dass Öl und Wasser gleichberechtigt in hohen Konzentrationen vorhanden sind [29].

Eine wesentliche Rolle spielt auch das Lösungsmittel, das einen großen Einfluss auf die Eigenschaften der IML hat. Allgemein steigt die Assoziationstendenz der Tensidmoleküle mit der Lipophilie des Lösungsmittels [26, 34, 49]. Als Grund wird die höhere Abnahme der Grenzflächenenergie in lipophileren Medien diskutiert. Bei polareren lipophilen Lösungsmitteln wie Benzol oder Chloroform wird sogar ein Ausbleiben der Mizellisation beobachtet [26, 49, 50], was durch einen Ladungstransfer zwischen Tensid- und Lösungsmittelmolekül erklärt wird [50]. Die eben zitierten Werke beziehen sich auf die Assoziation nichtionischer Tenside. Für Lecithinassoziate findet It. Kumar et al. ein Wachstum zu zylindrischen Mizellen bei Wasserzugabe nur beim unpolaren Cyclohexan statt, während in Benzol und Tetrachlorkohlenstoff sphäroide Mizellen vorherrschen [48].

Als Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung invers mizellarer Systeme dienen spektroskopische Methoden wie NMR und IR-Spektroskopie, sowie UV- und Fluoreszenzspektroskopie nach Solubilisation von Farbstoffen. Diese Methoden geben Aufschlüsse über die Beweglichkeit und den Einbau von Tensid- und Wassermolekülen in die Mizellen. Kalorimetrische Messungen dienen zur Quantifizierung der bei der Mizellisation und beim Einbau von Wasser auftretenden Bildungsenthalpien. Zur Ermittlung der Größe und der Form der Aggregate dienen die statische und die auch unter dem Namen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bekannte dynamische Lichtstreuung. Als genaueste Methoden auf diesem Gebiet werden die diffuse Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung (SAXS, SANS) eingesetzt. Das makroskopische Verhalten des gesamten Systems kann mit Leitfähigkeits- und Viskositätsmessungen erfasst werden.

### **2.2.2 Inverse Mizellen anionischer Tenside**

Das unter dem Namen Aerosol OT (AOT) bekannte anionische Tensid Natrium Bis-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinat ist das neben den Lecithinen am häufigsten untersuchte Amphiphil, das inverse Mizellen bildet. Die Fähigkeit zur Bildung inverser Mizellen ist durch die zwei voluminösen Seitenketten aus geometrischen Gründen zu erklären. Aerosol OT wurde in seiner Grundform oder in leicht abgewandelten Formen, z.B. mit anderen Kationen eingesetzt [51].

Die Assoziatbildung anionischer Tenside in lipophilen Medien erfolgt nach dem *multi-equilibrium* Modell, demzufolge existiert nur eine unscharfe CMC. Durch osmometrische Messungen [34, 52] und Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung [53] konnte dieses Modell bestätigt werden. Letztere Studie geht von einem *open association* Modell aus, in dem alle Tensidmoleküle assoziiert vorkommen, was ein Ansteigen der Assoziationszahl und damit der Mizellgröße mit zunehmender Tensidkonzentration nach sich zieht. Ist diese Annahme korrekt, sind Bestimmungen der Anisometrie inverser Mizellen über Verdünnungsreihen durch die Ermittlung der *intrinsic viscosity* [54] stark fehlerbehaftet und damit mit Vorsicht zu betrachten [53]. Nach Eicke [34] verändert sich die Assoziationszahl und damit die Mizellgröße ab einer bestimmten Tensidkonzentration nur noch leicht (Abb. 2.6), was eher auf einen *closed association* Prozess hindeutet. Dieser Bereich der Konzentration wird deshalb häufig als die CMC für inverse Mizellen bezeichnet [34, 52].

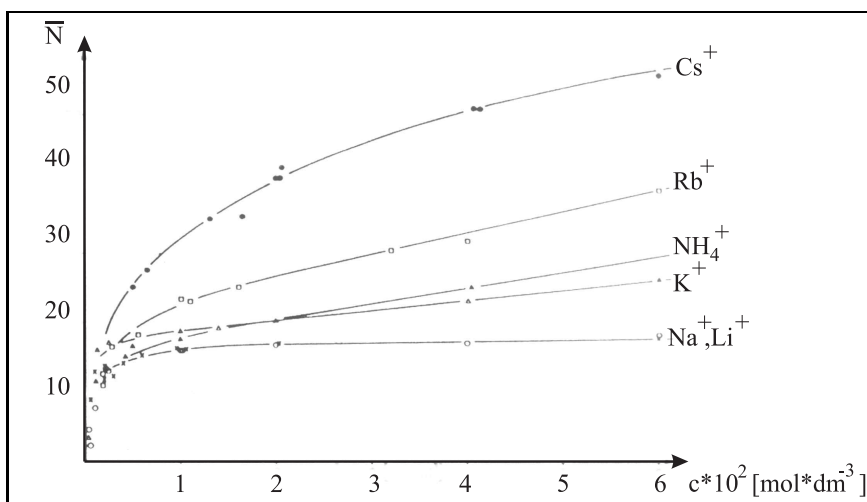


Abbildung 2.6: Mittlere Assoziationszahl  $\bar{N}$  von Di-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinaten mit verschiedenen Kationen in *i*-Octan in Abhängigkeit der Tensidkonzentration. Im Übergang in den linearen Bereich wird die CMC angenommen. Aus [34].

Der Einfluss von Wasser auf die Assoziation zu inversen Mizellen wird unterschiedlich bewertet. Eicke geht von H-Brücken als entscheidenden mizellbildenden Faktor aus [34]. In diesem Fall ist das Vorhandensein von Restmengen an Wasser zur Mizellisation erforderlich. Diese Restmenge ist nach Zulauf und Eicke in apolaren Lösungsmitteln wie in diesem Fall *i*-Octan vorhanden [47]. Systeme mit einem angegebenen  $w_0$  von Null müssen demnach speziell präpariert sein [49]. Einen gegensätzlichen Effekt beobachteten Yu et al. mit dem anionischen Tensid Na-bis-(2-ethylhexyl)-phosphat [55, 56], die mittels Lichtstreuung bei speziell dehydrierten Materialien eine scharfe CMC und deutlich größere, zylindrische Assoziate nachweisen konnten. Als Konsequenz aus ihren Resultaten schreiben sie dem Wasser einen Anti-Mizellisations-Effekt zu [55].

Inverse AOT-Mizellen sind in der Lage, hohe Mengen an Wasser aufzunehmen. Die Wasseraufnahmefähigkeit nimmt mit der Kettenlänge des Lösungsmittels ab [31] und kann bei kurzkettigen Lösungsmitteln wie *n*-Hexan bis zu  $w_0=100$  betragen [57]. Mit SAXS- und PCS-Messungen kann die Größe der Mizellen in Abhängigkeit des Wassergehaltes bestimmt werden. Der lineare Zuwachs der Mizellgröße deutet auf ein kontinuierliches Wachstum über den ganzen Bereich hin, wie es für isotrope bzw. sphäroide Mizellen erwartet wird [57–59]. Die Kugelform der AOT-Mizellen wird durch die Symmetrie der aus der SAXS resultierenden Elektronenabstandsfunktionen bestätigt (Abb. 2.7) [31, 59].

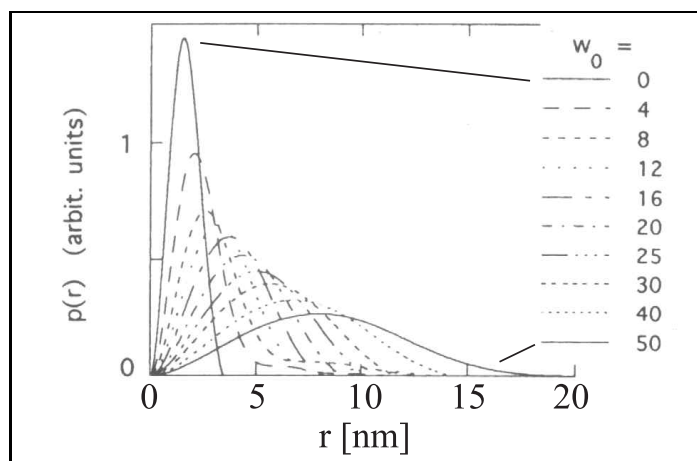


Abbildung 2.7: Elektronenabstandsfunktionen  $p(r)$  von 0.1 M AOT/*n*-Heptan in Abhängigkeit des  $w_0$ -Werts. Aus [59].

Kalorimetrische Studien [60] sowie  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie [61] zeigen, dass sich der Zustand des gebundenen Wasser stark mit  $w_0$  ändert. Die ersten hinzugefügten Wassermoleküle ( $w_0 = 1-3$ ) dienen der Hydratation der Kopfgruppen und damit der Stabilisierung der durch H-Brücken zusammengehaltenen Mizellassoziate. Weiteres hinzugefügtes Wassers ( $w_0 = 4-14$ ) bildet durch sekundäre Hydratation eine Art „Wasserschicht“ [30]. Erst bei höheren Wassergehalten  $w_0 > 15$  nähert sich der Zustand des Wassers dem des freien Wassers an [60], ohne diesen Zustand vollständig zu erreichen [62]. In solchen Systemen mit Bulkwasser ist es dann möglich, hydrophile Fremdschubstanzen im Inneren der Mizelle zu lösen [43, 61, 63], die bei geringerem  $w_0$  mit H-Brücken relativ fest an das Tensid gebunden vorliegen. Aus diesem Grund werden solche Systeme häufig fälschlich als Mikroemulsionen bezeichnet.

### 2.2.3 Inverse Mizellen kationischer Tenside

Inverse Mizellen kationischer Tenside unterscheiden sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften nicht wesentlich von denen anionischer Tenside. Verbeeck et al. ermittelten durch Fluoreszenz- und UV-Spektroskopie, dass die Aggregation von Didodecyl-dimethylammoniumchlorid (DDAC) in Toluol nach dem *stepwise association* Modell vonstatten geht [64]. Die geringe Wasseraufnahmefähigkeit von  $w_0 = 12$  erklären die Autoren mit der geringen Hydrophilie der Ammoniumgruppe des Tensids. Petit et al. erreichen für Dodecyl-trimethylammoniumchlorid (DTAC) in *n*-Heptan eine dem AOT vergleichbare Wasseraufnahmefähigkeit von  $w_0 = 70$ , allerdings nur in Anwesenheit des Kotensids Hexanol [65]. Correll et al. fanden ein mit AOT-Mizellen vergleichbares Verhalten der Solubilisation von Wasser für Dodecylammonium-Propionat (DAP) in Cyclohexan [25]. Polare Solubilisate sind demnach bei niedrigem Wassergehalt nahe an den Kopfgruppen der Tenside lokalisiert, um bei hohem  $w_0$  im Bulkwasser der Mizellen gelöst vorzuliegen [25].

### 2.2.4 Inverse Mizellen nichtionischer Tenside

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wiesen Debye und Prins [49] eine Assoziation von Glycerolmonoestern in Benzol durch Lichtstreuexperimente nach. Durch IR-Spektroskopie wurde von den Autoren die Existenz intermolekularer H-Brücken in den Assoziaten bestätigt. Weil diese H-Brücken bei den nichtassoziierten Molekülen im polareren Chloroform ausgeblieben sind, wurden sie von den Autoren als für die Mizellisation entscheidend angenommen. Eine Assoziation der Monoglyceride in Benzol wurde allerdings auch in speziell getrockneten Systemen nachgewiesen [49].

Die weitaus meisten Untersuchungen zur Bildung inverser Mizellen nichtionischer Tenside wurden mit ethoxylierten Fettalkoholen durchgeführt. Aus Neutronenstreuungsuntersuchungen von  $C_{12}(EO)_4$  in Alkanen ermittelten Ravey et al. die Form der Mizellen als strangartige *hank-like micelles* (Abb. 2.3d). Nach Wasserzusatz wachsen diese deutlich zu lamellenartigen Assoziaten an [26]. Kawai et al. fanden durch Lichtstreuexperimente an  $C_{12}(EO)_6$  in *n*-Dekan eine relativ scharfe CMC, unterhalb der maximal Dimere vorhanden sind [66]. Nach Überschreiten der CMC setzt eine schrittweise Assoziation der Moleküle zu Mizellen ein, wobei sich in wasserfreien Systemen eine weitaus geringere Assoziationstendenz zeigt als in wasserhaltigen Systemen (Abb. 2.8). Durch Untersuchungen an ethoxylierten (Tetramethylbutyl)-phenylether (Triton X-100) entdeckten Zhu et al., dass sowohl Wasser- als auch Tensidzusatz die Mizellgröße erhöhen [50]. Rillmann konnte dagegen durch SAXS-Studien an Sorbitanfettsäureestern (Span 60) in Alkanen keine signifikante Größenänderung sowohl bei zunehmender

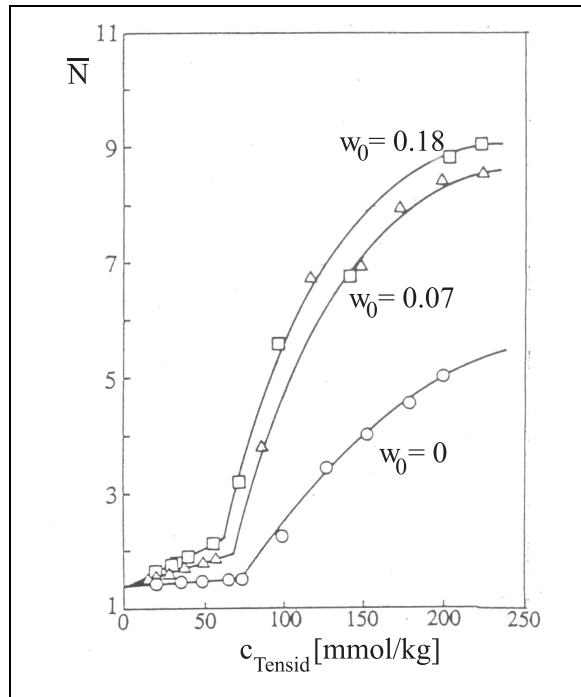


Abbildung 2.8: Mittlere Assoziationszahl  $\bar{N}$  von  $\text{C}_{12}(\text{EO})_6$  in  $n$ -Dekan in Abhängigkeit des Tensid- und Wasseranteils. Aus [66]. Eine vom Wassergehalt abhängige scharfe CMC ist zu erkennen.

Tensidkonzentration als auch bei Wasserzugabe feststellen [31].

Analog zum Zustand solubilisierten Wassers in inversen Mizellen ionogener Tenside fanden Kawai et al. zwei Zustände des Wassers. Bis zu einem  $w_0$  von etwa 5 werden die Ethoxy-Gruppen des Tensids hydratisiert. Weiter hinzugefügtes Wasser wechselwirkt mit der Hydrathülle und bildet eine sekundäre Hydratationsschicht [66]. Freies Wasser kann nicht festgestellt werden. Qi und Ma entdeckten in quaternären Systemen Triton X-100/ $n$ -Hexanol/Cyclohexan/Wasser drei Zustände [67]. Die primäre und die sekundäre Hydratation sind bei  $w_0 \approx 6$  abgeschlossen; bei weiterem Wasserzusatz ist in den Mizellen Bulkwasser nachzuweisen. Die Fähigkeit zur Aufnahme von Bulkwasser könnte durch die Anwesenheit des Kotsids Hexanol zu erklären sein. Olofsson et al. postulieren im Gegensatz zu dem in Abb. 2.8 dargestellten Verhalten eine Mizellbildung erst nach einer primären Hydratation der Ethoxy-Gruppen [68].

Die vergleichsweise großen Blockpolymere sind ebenfalls in der Lage, in apolaren Lösungen Aggregate zu bilden. Ein Modell von Legrand geht von einem massiven Kern aus, von dem die beweglichen unpolaren Reste ins Lösungsmittel hineinragen (Abb. 2.9) [69]. Weitere Modelle gehen von blumenähnlichen Strukturen sowie lose verzweigten, verbundenen Strukturen aus [70]. Die Struktur der Aggregate und der Assoziationsprozess hängen von der Art des verwendeten Polymers sowie der Art des Lösungsmittels ab. Mit

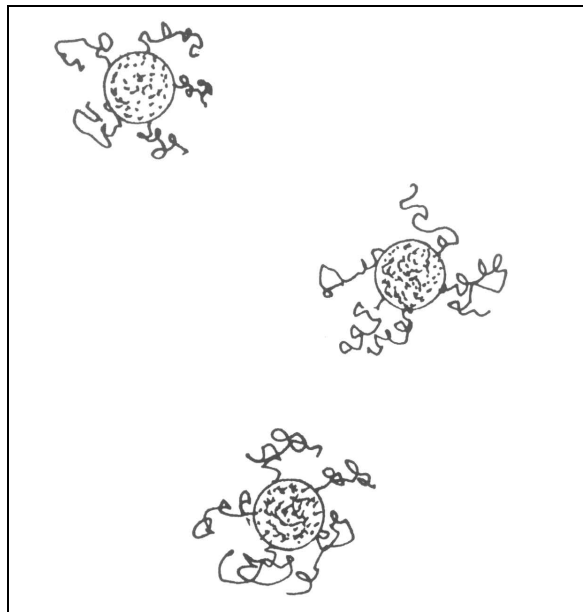


Abbildung 2.9: Modelle einfacher Diblock-Polymer-Mizellen in apolaren Lösungsmitteln. Nach Legrand [69].

zunehmendem Wassergehalt entdeckten Zhou et al. mit SAXS-Messungen an Mizellen aus Pluronic P103 in *o*-Xylol ein deutliches Anwachsen des Mizellkerns auf Kosten des lipophilen Teils, das durch ein Auflösen größerer Anteile der hydrophilen Blöcke des Polymers im zugefügten Wasser zu erklären ist [70].

### 2.2.5 Die lecithinhaltige invers mizellare Lösung

Das zwitterionische Lecithin lässt sich nicht in die bisher aufgeführten Kategorien inverse Mizellen bildender Tenside einordnen. In den meisten in der Literatur untersuchten Systemen wird gereinigtes Sojalecithin verwendet, das zu einem großen Teil aus Phosphatidylcholin besteht (Abb. 2.10). Die polare Kopfgruppe des Phosphatidylcholins besteht aus der negativ geladenen Phosphat- und der positiv geladenen Trimethylammonium (TMA)-Gruppe. Die Kopfgruppe ist über eine Glycerolstruktur mit zwei Fettsäuren verestert, die den lipophilen Bereich des Lecithins bilden.

Im Jahr 1929 entdeckten Price und Lewis, dass Lecithine in Benzol als Assoziate mit höherem Molekulargewicht vorliegen [71]. Elworthy identifizierte diese Assoziate 30 Jahre später als inverse Mizellen [72]. Ähnlich den inversen Mizellen nichtionischer Tenside beschreibt auch Elworthy eine scharfe CMC, unterhalb der nur sehr kleine Aggregate zu finden waren. Diese kleinen Aggregate beschreiben Giomini et al. als Di- und Trimere [73], weshalb auch bei Lecithinen von einer *stepwise association* ausgegangen werden kann.

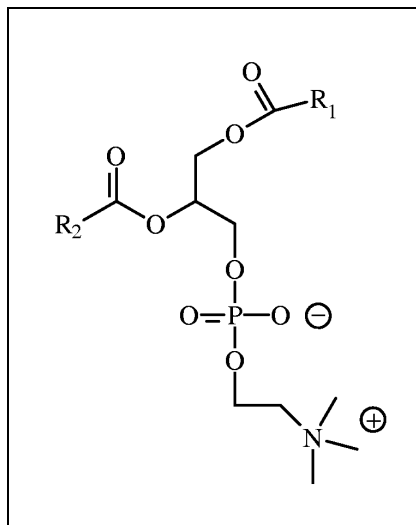


Abbildung 2.10: Strukturformel des Phosphatidylcholins;  $R_1$ ,  $R_2$  : Fettsäurereste.

Das Interesse an Lecithinassoziaten stieg in den nachfolgenden Jahrzehnten wegen der Ähnlichkeit zu biologischen Membranen rapide an. Aus diesem Grund gewannen auch lecithinhaltige inverse Mizellen an Bedeutung. Die Auswirkungen der Wechselwirkungen von Lecithin mit Fremdmolekülen und Wasser auf inverse Mizellen sind vergleichsweise einfach zu interpretieren, da Austauschprozesse zwischen extra- und intrazellulären Kompartimenten nicht berücksichtigt werden müssen [74]. So untersuchten Boicelli et al. die Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren bzw. Oligopeptiden und Lecithin mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studien an wasserhaltigen inversen Mizellen aus Lecithin in Chloroform und Benzol, um diese Resultate später auf Zellmembranen übertragen zu können [74]. Die Autoren fanden, dass die Fremdmoleküle den Zustand des in den Mizellen gebundenen Wassers ändern.

Ebenfalls mit NMR-Spektroskopie bestimmten Fung und McAdams den Zustand von Wasser in Mizellen aus Lecithin in Tetrachlorkohlenstoff. Demnach ist nur ein Wassermolekül pro Lecithin stark gebunden [75]. Dieses direkt an die Phosphatgruppe gebundene Molekül unterbricht eine in wasserfreien Systemen auftretende elektrostatische Interaktion zwischen der Phosphat- und der TMA-Gruppe des Lecithin-Moleküls bzw. zwischen den Gruppen entsprechender benachbarter Moleküle [76]. Deshalb wird Wasser direkt für die Mizellisation von Lecithin verantwortlich gemacht [75]. Die inversen Lecithin-Mizellen weisen ein ähnliches Solubilisationsverhalten wie AOT-Mizellen auf. Wasser lässt sich in relativ hohen Konzentrationen bis etwa  $w_0 = 20$  in den Kernbereich einarbeiten [77]. Die Mizellen zeigen ein gleichmäßiges Wachstum zu größeren sphäroiden Assoziaten, in denen das Wasser ab einem  $w_0$  von etwa 8 als quasi



freies Wasser im Kern vorliegt [77].

Im Jahre 1983 machten Kumar et al. die Entdeckung, dass die Lecithinassoziate das eben beschriebene Verhalten nicht in allen Lösungsmitteln zeigen [48]. In Cyclohexan beispielsweise sorgt hinzugefügtes Wasser für ein eindimensionales Wachstum zu langen, zylindrischen Assoziaten, was Kumar et al. elektronenmikroskopisch abbilden konnten. Als weiterer Hinweis auf ein Zylinderwachstum kann ein sprunghafter Anstieg der Viskosität bei etwa  $w_0 = 6$  gewertet werden. Leitfähigkeitsmessungen zeigen jedoch, dass keine kontinuierliche Wasserphase vorliegt. Es ist deshalb von einzelnen, röhrenähnlichen Aggregaten auszugehen [48], die nach dem *open association* Modell gebildet werden.

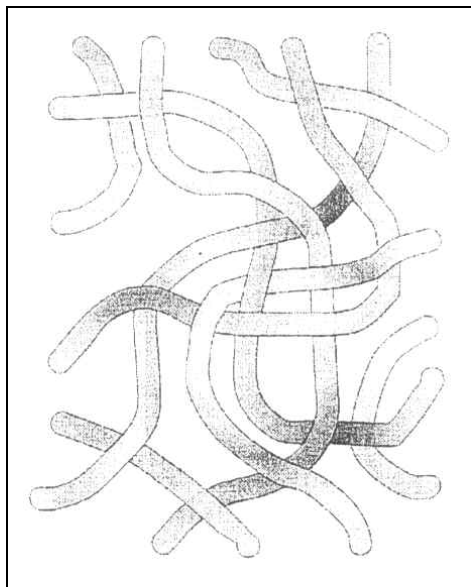


Abbildung 2.11: Modell verknäuelter lecithinhaltiger Spaghettimizellen. Aus [78].

Mittels rheologischer Untersuchungen entdeckten Scartazzini und Luisi [1], dass die auf Zylinderwachstum hinweisende massive Viskositätssteigerung bei sehr vielen organischen Lösungsmitteln auftritt. Diese als *Organogele* bezeichneten Systeme entstehen in allen untersuchten aliphatischen und cyclischen Kohlenwasserstoffen sowie in Estern wie z.B. Isopropylmyrsinat und -palmitat. Die zur Gelbildung benötigte Menge an Wasser ist bei den cyclischen Lösungsmitteln mit  $w_0 = 6 - 12$  vergleichsweise groß; am geringsten ist sie mit  $w_0 = 1$  bei den extrem apolaren langkettigen Paraffinen wie *n*-Dodekan. Da das rheologische Verhalten dem von Polymeren in Lösung sehr ähnlich ist, nannten Schurtenberger et al. diese Mizellen auch *polymer-like micelles* [37]. Andere gebräuchliche Namen dieser Systeme sind der von analogen wässrigen Systemen abgeleitete Name *worm-like micelles* oder *spaghetti-like micelles*. Letzterer ist zur bildlichen Vorstellung

dieser Systeme am geeignetsten, da die Viskositätserhöhung durch eine Verknäuelung äußerst langer, flexibler zylindrischer Mizellen verursacht wird (Abb. 2.11). Bei dieser Vorstellung muss aber berücksichtigt werden, dass die Spaghettimizellen sich in ihrem dynamischen Verhalten im ständigen Austausch zerteilen und wieder zusammenfügen.

Die Hypothese einer ungeordneten, verknäuelten Spaghetti-Struktur ist das Ergebnis von Untersuchungen von Schurtenberger et al., die weder Texturen in der Polarisationsmikroskopie noch Strukturen bei der Röntgenbeugung offenbarten [2]. Eine geordnete Struktur kann dadurch ausgeschlossen werden. Das Ausbleiben einer Anisotropie der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale untermauert diese These. Eine Verknäuelung der Spaghettimizellen kann jedoch nur oberhalb einer systemabhängigen, definierten Lecithinkonzentration, der *Crossover-Konzentration*  $\Phi^*$  nachgewiesen werden [2]. Unverständlicherweise belegen Schurtenberger et al. diese Systeme mit der Bezeichnung Mikroemulsionen, was aufgrund der fehlenden freien Wasserphase als inkorrekt angesehen werden muss.

Den wesentlichen Unterschied im Assoziationsverhalten der Lecithine in den polaren lipophilen Lösungsmitteln Benzol, Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff zu den apolaren Lösungsmitteln erklären Maitra et al. durch die Lokalisation von Benzolmolekülen nah bei den polaren Gruppen des Lecithins [77]. Das Benzol nimmt quasi die Rolle eines Kotensids ein und sorgt damit – ähnlich wie bei den Mikroemulsionssystemen – für die Ausbildung von freiem Wasser im Innern der Mizellen. Im gleichen Kontext sei erwähnt, dass Lecithine mit kurzkettigen Fettsäureresten ( $\text{C}_6 - \text{C}_8$ ) in *i*-Octan keine Spaghettimizellen, sondern kleine, runde Mizellen bilden. In Anwesenheit des Kotensids Hexanol können so bis zu 60 Moleküle Wasser pro Lecithinmolekül aufgenommen werden [79]. Die Ausbildung von Spaghettimizellen ist also nicht bloß vom Lösungsmittel abhängig, sondern zusätzlich nur mit längerkettigen Lecithinen möglich.

Als Mechanismus zur Bildung der Spaghettimizellen wird im wesentlichen die Ausbildung von H-Brückenbindungen angenommen, die die Phosphatgruppen der Lecithin-Kopfgruppen kettenartig miteinander verbinden [81]. Diese Hypothese wird durch mehrere vor allem spektroskopische Arbeiten untermauert. So wird postuliert, dass ein Wassermolekül direkt an die Phosphatgruppe gebunden ist [75, 76]. Drei weitere Wassermoleküle hydratisieren demnach die Phosphatgruppe in einer ersten Hydratationsschicht, während weitere 4 Moleküle für eine zweite Hydratationsschicht sorgen [77]. Freies Wasser oder Bulkwasser ist in inversen Spaghettimizellen niemals zu finden [82].

Mit zunehmendem Wassergehalt nimmt nicht nur die Beweglichkeit der Wassermoleküle, sondern auch die Beweglichkeit der TMA-Gruppe zu [76]. Gleichzeitig entdeckten

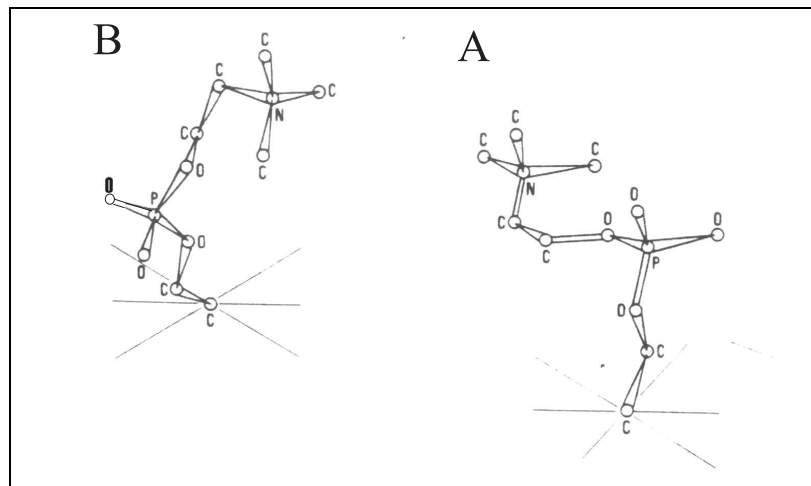


Abbildung 2.12: Konformationsänderung der Kopfgruppe des Lecithins nach Capitani et al. [80]. A: Kopfgruppe senkrecht zu den Kohlenwasserstoffketten im wasserfreien System (*gauche*). B: Kopfgruppe parallel zu den Kohlenwasserstoffketten im hydratisierten Lecithin (*trans*).

Capitani et al. durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen eine durch das erste gebundene Wassermolekül induzierte Konformationsänderung der Kopfgruppe von einer Orientierung senkrecht zur Molekülachse (*gauche*) in eine Orientierung parallel zur Molekülachse des Lecithins (*trans*) (Abb. 2.12) [80]. Demzufolge findet eine Art Entfaltung der Kopfgruppe des Lecithins statt. Im hochviskosen Zustand nimmt die Beweglichkeit aller funktionellen Gruppen wiederum ab, was durch erhöhte Halbwertsbreiten der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale verdeutlicht wird [80].

Den Einfluss von aliphatischen und cyclischen Kohlenwasserstoffen als Lösungsmittel verdeutlichten Shervani et al. durch einen Vergleich zwischen Cyclohexan, *n*-Octan und *n*-Dodekan [83]. Die Ausbildung des hochviskosen Zustands setzt bei den aliphatischen Lösungsmitteln bei deutlich geringeren  $w_0$  ein (Abb. 2.13). Mit IR-Spektroskopie zeigten Shervani et al., dass die maximale Hydratation der Phosphatgruppe bei  $w_0 = 4$  nur beim Cyclohexan erreicht wird [83]. Bei höheren Wasseranteilen findet in den Lecithin/Cyclohexan-Systemen nachfolgend eine Hydratation der C=O-Gruppe statt. In *n*-Dodekan ist bei  $w_0 > 1$ , in *n*-Octan bei  $w_0 > 2$  keine weitere Wechselwirkung zwischen Wasser und Phosphatgruppe zu beobachten. Eine Hydratation der C=O-Gruppe bleibt aus. Durch diese Ergebnisse zeigten die Autoren, dass die Hydratation der Phosphatgruppe maßgeblich für die Ausbildung des hochviskosen Zustands verantwortlich ist [83]. Die Hypothese eines durch H-Brückenbindungen induzierten Wachstums von Spaghettimizellen wird mit diesen Ergebnissen untermauert.

Im gleichen Kontext ist die Interpretation der IR-Messungen von Shumilina et al. zu sehen [84], obwohl die Messergebnisse (Lecithin/*n*-Dekan/Wasser) einige Unterschiede

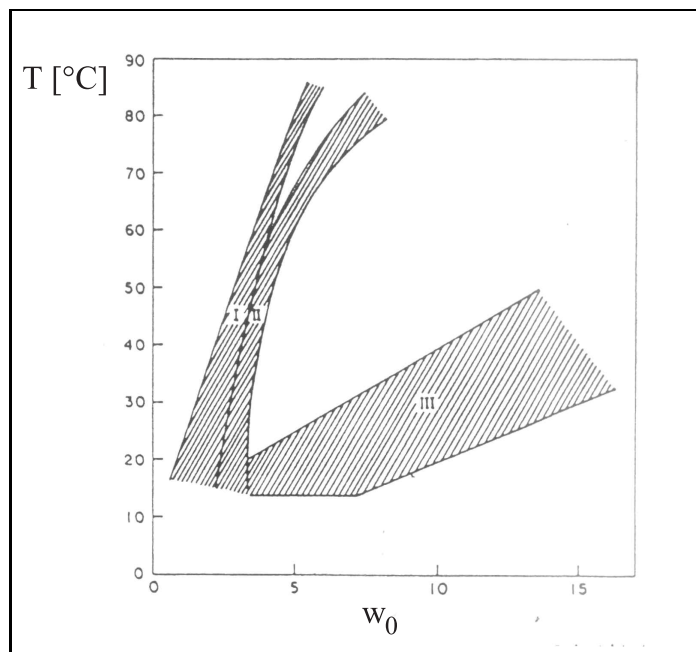


Abbildung 2.13: Hochviskose Zustände der invers mizellaren Lösungen (I) Lecithin/*n*-Dodekan/Wasser; (II) Lecithin/*n*-Octan/Wasser; (III) Lecithin/Cyclohexan/Wasser. Aus [83].

aufweisen. So findet in dieser Studie eine kontinuierliche Hydratisierung der Phosphatgruppe über den Bereich  $0 < w_0 < 5$  statt. Die Hydratation der Carbonylgruppe beginnt bei  $w_0 = 3$ . Die hypsochrome Verschiebung der TMA-Schwingung deutet auf eine höhere Beweglichkeit dieser Gruppe durch Konformationsänderung hin [84]. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten die Autoren ein Modell für die Verkettung der Lecithinmoleküle durch H-Brücken auf (Abb. 2.14). Aus ungeklärten Gründen beruht dieses Modell wie alle Modelle der Arbeitsgruppe Shchipunov et al. auf einer protonierten Phosphatgruppe [85]. Da Phosphatidylcholin jedoch über den gesamten pH-Bereich zwitterionisch vorliegt [86], ist dieses Modell diesbezüglich inkorrekt. Die Möglichkeit einer Verknüpfung der Phosphatgruppen durch H-Brücken ist dennoch gegeben, weshalb dieses Modell im Grundsatz weiter Gültigkeit hat.

Weitere Gründe für das eindimensionale Zylinderwachstum der Spaghettimizellen ist in der Abnahme des Packungsparameters  $P$  zu sehen. Durch Hydratation nimmt das Volumen der Kopfgruppe im Vergleich zum Rest zu. Hierdurch wird die Bildung inverser Kugelmizellen benachteiligt. Die Verhinderung energetisch ungünstiger abgerundeter Enden der Mizellen, sog. *end caps* als Grund für das Zylinderwachstum wird von Appell et al. in Bezug auf wässrige Mizellen diskutiert [87] und von Shchipunov et al. auch auf inverse Spaghettimizellen übertragen [81]. Letztere Autoren stellten die Hypothese auf, dass Fremdmoleküle wie Alkyglykoside die Bildung von *end caps* erschweren bzw. erleichtern können und somit das Mizellwachstum nachhaltig beeinflussen.

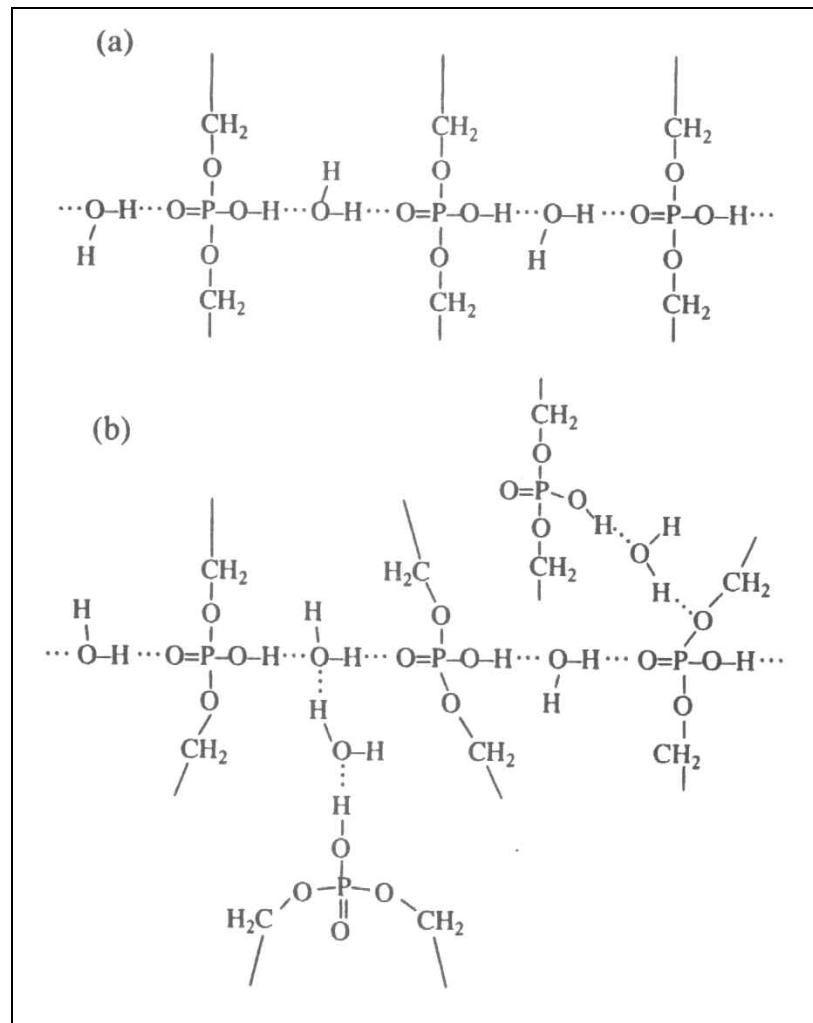


Abbildung 2.14: Modell der Verkettung der Lecithinmoleküle in inversen Spaghettimizellen durch H-Brücken zwischen den Phosphatgruppen (a). Verzweigung bei höherem  $w_0$  (b). Aus [84].

Die Untersuchung von Spaghettimizellen als individuelle Partikel ist mit großen Schwierigkeiten verbunden. Für eine Partikelcharakterisierung mit Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) oder Kleinwinkelstreuung (SAXS, SANS) müssen die Partikel isoliert vorliegen; eine Wechselwirkung mit benachbarten Partikeln führt zu Messfehlern und ist deshalb möglichst zu verhindern. Die dafür erforderlichen starken Verdünnungen der Systeme ziehen selbstverständlich eine Systemveränderung nach sich [88]. Die Mizellen, die nach einer Verdünnung untersucht werden, stimmen allgemein nicht mit denen des Ursprungssystems überein. Schurtenberger und Cavaco bestimmten den hydrodynamischen Radius von Spaghettimizellen in Cyclohexan in Abhängigkeit der Lecithin- und Wasserkonzentration und fanden deutliche quantitative Unterschiede der Mizellgröße bei unterschiedlichen Lecithinkonzentrationen, die verdeutlichen, dass es ei-

ne Tendenz zu größeren Aggregaten bei kleineren Konzentrationen gibt (Abb. 2.15) [89]. Der starke Einbruch zu sehr kleinen Lecithinkonzentrationen zeigt, dass dort nicht mehr genügend Masse für die Bildung großer Aggregate vorhanden ist. Vorgreifend auf die in dieser Arbeit untersuchten Systeme kann aus der Grafik geschlossen werden, dass bei den verwendeten Verdünnungen nur quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede festzustellen sind. Eine Größenbestimmung individueller Spaghettimizellen ist damit zulässig.

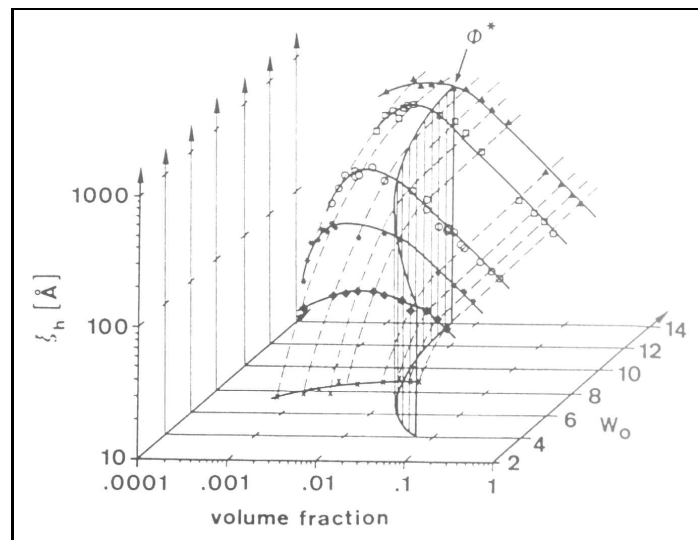


Abbildung 2.15: Hydrodynamischer Radius  $\xi_h$  in Abhängigkeit von Lecithin- (x-Achse) und Wasseranteil  $w_0$  (y-Achse). Aus [89]

Eine nachfolgende Messung der Partikeldimensionen mit SANS ergab, dass der Querschnittsdurchmesser zylindrischer Lecithin/Cyclohexan-Mizellen bei Wasserzugabe nur sehr leicht zunimmt, nämlich von  $r = 6$  nm bei  $w_0 = 6$  auf  $r = 7.5$  nm bei  $w_0 = 14$  [90]. Ein eindimensionales Wachstum kann somit bestätigt werden. Für Lecithin in *i*-Octan ermittelten Schurtenberger et al. bereits 1990 mit SANS und der Guinier-Methode einen Zylinderdurchmesser von  $r = 6$  nm [2].

Findet nach der Ausbildung des hochviskosen Zustands eine weitere Wasserzugabe statt, so nimmt die Viskosität des Systems rapide ab. Mit der Viskositätsabnahme findet ein Phasenübergang von den Spaghettimizellen in ein Zweiphasensystem statt [8, 37], von denen eine Phase aus einem lamellaren Flüssigkristall besteht. Versuche, die Systeme kurz vor dem Phasenübergang zu charakterisieren, resultieren in verschiedenen Interpretationen:

- Luisi et al. postulieren die Existenz eines Netzwerks verknäuelter Spaghettimizellen oberhalb einer kritischen Lecithinkonzentration  $\Phi^*$  [91]. Durch SANS-Messungen

wird dieses geometrische Modell flexibler, zylindrischer Mizellen untermauert. Die Mizellen weisen eine unwesentliche Abhängigkeit des Zylinderquerschnitts von  $w_0$  auf [90].

- Aliotta et al. schlagen eine bikontinuierliche, schwammähnliche Struktur vor [92]. Diesen Strukturvorschlag erhalten die Autoren aus einer vermeintlichen Interferenz in ihren SANS-Streukurven, die jedoch auch aus einem Konzentrationseffekt resultieren kann. Gegen dieses Modell spricht, dass Kumar et al. keine deutliche Erhöhung der Leitfähigkeit an der Phasengrenze feststellten [48].
- Eine Rücktransformation von Spaghettimizellen zu Kugeln während und nach der Phasentransformation vermuten Angelico et al. durch die Einschränkung der Beweglichkeit des Wassers in den Systemen nach der Phasentransformation [93]. Hier soll ein Netzwerk neben den Kugeln entstehen, über dessen Aussehen die Autoren jedoch keine Angabe machen.
- Aus der Anpassung ihrer rheologischen Daten an verschiedene Modelle postulieren Shchipunov et al. eine Verzweigung der Spaghettimizellen kurz vor dem Phasenübergang, die durch multiple Wasserstoffbrücken induziert wird (Abb. 2.14b) [81, 94]. Fremdmoleküle, die mehrere H-Brücken ausbilden können, unterstützen diesen Prozess der Verzweigung [81]. Das Auftreten von Verzweigungen wird inzwischen auch von Aliotta et al. angenommen [82].

Eine ausführliche rheologische Untersuchung des Phasenübergangs von Müller [3] identifizierte das hochviskose, gelartige System aus Spaghettimizellen als ein Sol, das unter weiterer Addition von Wasser erst deutlich nach der Phasentransformation in ein niedrigviskoses Gel übergeht. Dieses Gel kann als schwammähnliches System angenommen werden.

## **2.3 Die invers mizellare Lösung als Drug Delivery System**

Die Solubilisation von Arzneistoffmolekülen in inverse Mizellen ist von großem pharmazeutischen Interesse. So werden Drug Delivery Systeme auf Basis einer lecithinhaltigen IML vorgeschlagen, die entweder als Retardsystem fungieren oder den Arzneistofftransport als Enhancer erleichtern. Die Retardformulierung erfolgt durch den Kontakt der IML mit Wasser und der damit verbundenen Phasentransformation in einen lamellaren Flüssigkristall im Grenzbereich Wasser/IML. Müller-Goymann und Hamann beschrieben 1993 erstmals die Eignung eines invers mizellaren Systems aus Lecithin

und Isopropylmyristat als Retardformulierung [8]. Der Einbau der Arzneistoffe in die Flüssigkristalle erlaubt eine diffusionsgesteuerte kontrollierte Arzneistofffreigabe. Die Anwendung dieses Konzeptes auf perorale Weichgelatine kapseln wurde von Papantoniou untersucht [95], während Schneeweis [41] die rektale Anwendung von in Weichgelatine kapseln eingefüllten IML testete. Müller [96] sowie Tegtmeyer [10] betrachteten ein auf der IML basierendes ophthalmologisches Drug Delivery System. Ein Modell zur intramuskulären Anwendung einer mit Rifampicin beladenen IML als Retardformulierung beschreiben Uppadhyay et al. [97]. Bei allen getesteten Arzneiformen mit Ausnahme der peroralen Weichgelatine kapseln konnte ein Retardeffekt festgestellt werden.

Bei dermatologischer Anwendung offeriert die invers mizellare Lösung ein völlig anderes Anwendungsspektrum. Bereits 1991 entdeckten Willmann et al. [4] die Eignung einer IML aus Lecithin und Isopropylpalmitat bzw. *i*-Octan als Vehikel für den transdermalen Transport. Als Modell-Arzneistoffe für die Untersuchungen dienten Scopolamin und Broxaterol. Den Autoren gelang es zudem, Peptide und Aminosäuren mit dieser Art von Träger durch die Haut zu permeieren. Bhatnagar und Vyas zeigten 1994 in ihrer Arbeit die Anwendbarkeit einer mit Propranolol beladenen Lecithin/*i*-Octan-IML als Penetrationsenhancer für die transdermale Permeation [5]. Bonina et al. berichten über die Eignung lecithinhaltiger IML für die transdermale Penetration, während eine Arzneistoffanreicherung in der Haut eher bei liposomalen Trägern erhalten wird [6].

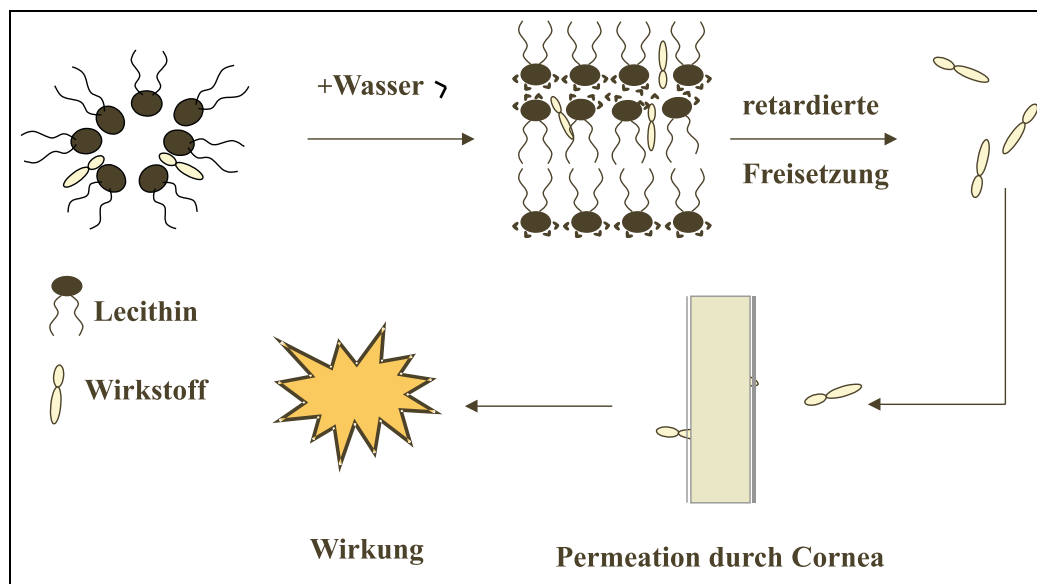


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung eines auf einer IML aufbauenden Drug Delivery Systems zur Anwendung am Auge.



### 2.3.1 Prinzip des Drug Delivery Systems

Das von Müller [96] und Tegtmeier [98] zur ophthalmologischen Anwendung konzipierte Drug Delivery System ist auch Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit. Aus diesem Grund ist das Prinzip des Drug Delivery Systems am Beispiel einer ophthalmologischen Applikation in Abb. 2.16 schematisch dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wird vor allem mit Arzneistoffen zur Anwendung am Auge, wie Timolol und Pilocarpin gearbeitet. Der Arzneistoff ist in die inversen Lecithin-Mizellen eingebaut. Durch den Kontakt mit der Tränenflüssigkeit kommt es zur Bildung eines lamellaren Flüssigkristalls, aus dem dann eine verzögerte Wirkstofffreigabe erfolgen kann. Der freigesetzte Wirkstoff permeiert nachfolgend durch die Cornea ins Kammerwasser, wo er seine Wirkung entfaltet. Mit diesem Retardprinzip kann an exzidiierter boviner Cornea eine um den Faktor 18 (70) verzögerte Freigabe bei Pilocarpin (Timolol) gegenüber wässrigen Formulierungen erhalten werden [10, 98]. Allerdings werden nur etwa 1% des Wirkstoffes überhaupt am Wirkort wiedergefunden [96], was evtl. höhere Arzneistoffkonzentrationen in der Retardformulierung erforderlich macht.

### 2.3.2 Lamellare Flüssigkristalle

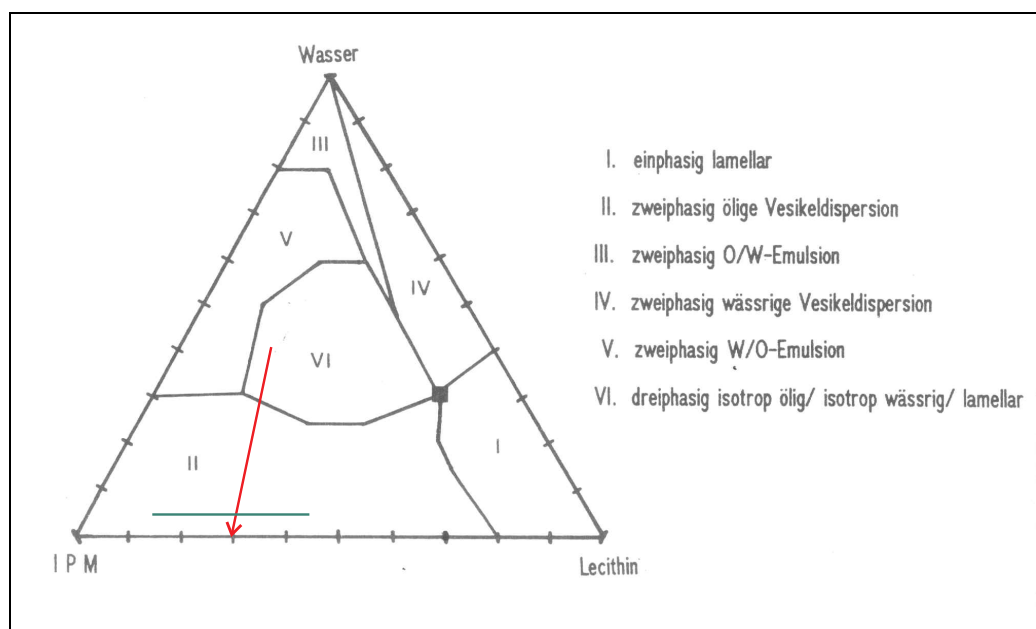


Abbildung 2.17: Phasenverhalten des ternären Systems Lecithin/IPM/Wasser bei Raumtemperatur. Aus [18]. Roter Pfeil: Untersuchte Systeme. Grüne Linie: Phasenübergang in ein invers mizellares System bei Wassergehalten von  $c_{aq} \approx 4\%$ .

Unter Einwirkung von Wasser transformiert die IML aus Lecithin und IPM in einen

lamellaren Flüssigkristall. Als Resultat seiner umfangreichen Untersuchungen des ternären Systems Lecithin/Isopropylmyristat/Wasser stellte Hamann ein Phasendiagramm auf (Abb. 2.17) [18]. Die für die Experimente dieser Arbeit relevanten Bereiche sind II und VI. In Bereich II beschreibt Hamann in Öl dispergierte lamellare Vesikel, während bei höheren Wassergehalten im Bereich VI eine W/O-Emulsion mit einer dispergierten Lamellarphase vorliegt (Abb. 2.17).

Lamellare Flüssigkristalle in dispergierter Form sind – mit Ausnahme der Systeme unter 4% Wasser – über den kompletten untersuchten Bereich (roter Pfeil in Abb. 2.17) zu erwarten. Die vereinfachte Struktur dieser auch als lamellare Mesophasen bezeichneten Tensidassoziate ist in Abb. 2.18 zu sehen. Als Charakteristikum der in eine Raumrichtung periodischen Struktur zeichnet sich die Bilayerdicke  $d$  ab.

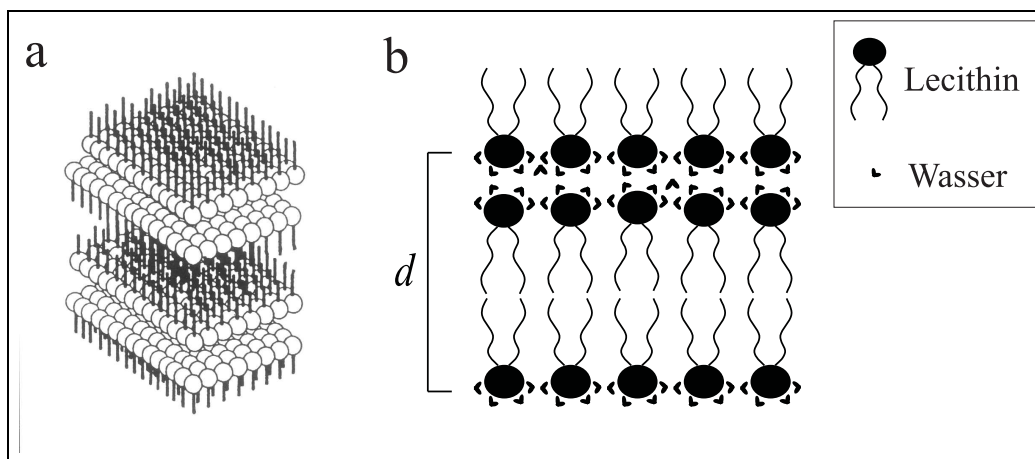


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung eines lamellaren Flüssigkristalls (a) 3-dimensionale Darstellung (entnommen aus [99]) (b) als Querschnitt mit Bilayerdicke bzw. Netzebenenabstand  $d$ .

Bei den hier ausgebildeten lamellaren Flüssigkristallen handelt es sich um lyotrope Flüssigkristalle. Diese entstehen durch Einwirkung eines Lösungsmittels auf amphiphile Substanzen. Thermotrope Flüssigkristalle, die durch thermisch induzierte Phasenübergänge entstehen, sind pharmazeutisch wenig relevant. Im Gegensatz zu den thermotropen Flüssigkristallen, die eine Ordnung anisotroper Moleküle darstellen, sind die lyotropen Mesophasen geordnete, flexible Kolloidassoziate [100]. Nicht alle amphiphilen Substanzen sind in der Lage, lyotrope Flüssigkristalle auszubilden. Small teilt amphiphile Moleküle (polar lipids) in vier Klassen ein [101]:

- Klasse I: Substanzen, die in Wasser praktisch unlöslich sind, können weder Flüssigkristalle noch Mizellen bilden. Beispiele sind Triglyceride, langkettige Fettsäuren und -alkohole.

- Klasse II: Substanzen, die in Wasser quellbar sind, können zwar Mesophasen, nicht aber Mizellassoziat formen. Als Beispiel sind die Lecithine zu nennen.
- Klasse IIIa: In Wasser lösliche Tenside, die in der Lage sind, sowohl Mizellen als auch lyotrope Mesophasen zu bilden. Dazu zählen die meisten Detergenzien, Salze langkettiger Fettsäuren sowie das einkettige Lysolecithin.
- Klasse IIIb: Tenside, die in Wasser ausschließlich Mizellen bilden können, wie z.B. Gallensalze.

Hinzuzufügen ist, dass Klasse I- und II-Lipide selbstverständlich in der Lage sind, in entsprechenden lipophilen Lösungsmitteln inverse Mizellen auszubilden. Da Phosphatidylcholin der Gruppe II angehört, ist ein lyotroper Mesomorphismus bei Wasserzugabe zu erwarten, der auch von Hamann beobachtet wurde [18].

Tabelle 2.1: Reflexfolgen lyotroper Flüssigkristalle aus der Röntgenkleinwinkelbeugung (nach Luzzati [102]).

| Mesophase | Reflexfolge bzgl. $d$   |
|-----------|---|
| Lamellar  | $1 : \frac{1}{2} : \frac{1}{3} : \frac{1}{4}$   |
| Hexagonal | $1 : \frac{1}{\sqrt{3}} : \frac{1}{\sqrt{4}} : \frac{1}{\sqrt{7}} : \frac{1}{\sqrt{9}} : \frac{1}{\sqrt{12}}$ |
| Kubisch   | $1 : \frac{\sqrt{3}}{\sqrt{4}} : \frac{\sqrt{3}}{\sqrt{8}} : \frac{\sqrt{3}}{\sqrt{11}}$                      |

Zur Identifikation der lamellaren Mesophase werden Röntgenkleinwinkelbeugung, Polarisations- und Elektronenmikroskopie angewendet. Die Elektronenmikroskopie bildet die Struktur der Kolloidassoziate direkt ab, d.h. man kann die lamellare Struktur direkt im Bild erkennen. Anhand der Reflexfolge der Beugungsbilder aus der Röntgenkleinwinkelbeugung lässt sich die Struktur der Flüssigkristalle ablesen. Mit diesem Prinzip kann die Lamellarphase von den beiden weiteren Hauptausprägungen lyotropem Mesomorphismus – der Hexagonalphase und der kubischen Phase – unterschieden werden. Nach Luzzati weisen die drei Grundstrukturen lyotroper Mesophasen diskrete Abfolgen der mit der Bragg'schen Beziehung ermittelten Strukturabstände  $d$  auf [102] (Tab. 2.1), wobei für die kubische Phase auch noch weitere Reflexfolgen bekannt sind [103].

Da es sich bei lamellaren Flüssigkristallen um optisch anisotrope, also doppelbrechende Systeme handelt, können sie anhand ihrer im Polarisationsmikroskop sichtbaren Texturscheinungen identifiziert werden. Texturbildend sind allerdings nur Strukturdefekte;

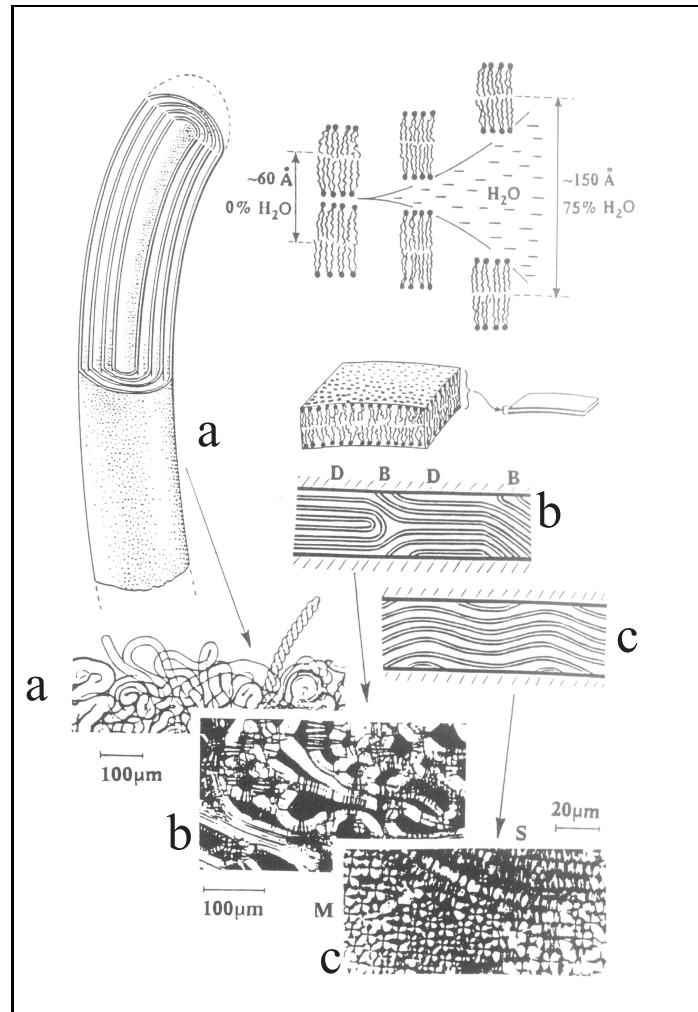


Abbildung 2.19: Texturen lamellarer Flüssigkristalle. (a) wasserreiche Myelinstruktur, abgebildet durch dünne Helices. (b) dicke, leuchtende *oily streaks*, hervorgerufen durch gekrümmte und schiefe Strukturen. (c) wasserarme, runzlige Multilayer und konfokale Strukturen werden durch Malteserkreuze abgebildet. Nach Bouligand [104].

ungestörte Strukturen sind einfarbig. Einen Überblick über die durch lamellare Strukturen und deren Defekte hervorgerufene Texturen gibt Abb. 2.19 [104]. Weitere Texturbeispiele für lamellare Mesophasen sind bei Saupe [105] zu finden. Eine Hexagonalphase zeigt dagegen eine fächerartige Textur, die leicht von der Textur der Lamellarphase zu unterscheiden ist [105, 106]. Kubische Mesophasen sind optisch isotrop und zeigen keine Texturercheinungen.

### 2.3.3 Solubilisierete Arzneistoffe

Ziel dieser Arbeit ist die physiko-chemische Charakterisierung der arzneistoffbeladenen lecithinhaltigen IML sowie der durch Kontakt mit Wasser entstehenden lamellaren Flüssigkristalle.

sigkristalle. Bei der Wahl der Modellarzneistoffe wurden mehrere Gesichtspunkte berücksichtigt. So wurden Arzneistoffe ausgewählt, die (a) ophthalmologisch anwendbar sind, (b) von denen bereits Resultate aus Untersuchungen mit der IML vorliegen [96, 107] und die (c) unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften aufweisen. Die Wahl fiel auf das amphiphile Diclofenac-Natrium, das hydrophile Pilocarpin-Hydrochlorid und das ebenfalls amphiphile Salz Timolol-Hydrogenmaleat. Die ersten beiden Substanzen wurden bereits von Papantoniou [107], die letztere von Müller [3, 96] in der IML untersucht. Um Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und IML erkennen zu können, werden in dieser Arbeit teilweise deutlich höhere als die therapeutisch angewendeten Konzentrationen eingesetzt, wobei eine deutliche Konzentrationserhöhung für Retardformulierungen durchaus sinnvoll sein kann.

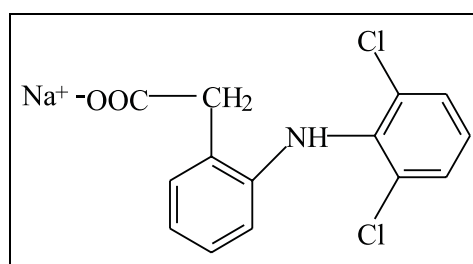


Abbildung 2.20: Strukturformel Diclofenac-Natrium (DNa).

- Das zur Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika gehörende **Diclofenac-Natrium** (DNa, Abb. 2.20) wird in dermalen Fertigarzneimitteln in Konzentrationen von  $c = 1 - 5\%$  (m/m) eingesetzt. Seit einiger Zeit gibt es auch ein Produkt zur Anwendung am Auge (Voltaren<sup>R</sup> ophtha), das für postoperative Entzündungssymptome des Auges indiziert ist [108]. Die Arzneistoffkonzentration beträgt in diesem Präparat allerdings nur  $c = 0.1\%$  (m/v), so dass sich die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen von  $c = 2 - 10\%$  an den dermalen Zubereitungen orientieren.

Die chemische Struktur des DNa zeigt die amphiphilen Eigenschaften des Moleküls, dessen hydrophiler Teil durch die Carboxylfunktion und der lipophile Bereich durch die beiden Ringsysteme gegeben ist. Die ebenfalls hydrophile Aminogruppe verliert wegen der Abschirmung durch die Chloratome ihren polaren Charakter [109].

- Das Parasympathomimetikum **Pilocarpin-Hydrochlorid** (PHCl, Abb. 2.21) wird zur Augeninnendrucksenkung in der konservativen Therapie des Glaukoms, im besonderen des Engwinkelglaukoms, eingesetzt [110, 111]. Durch die mittels Pilocarpin induzierte Dauerkontraktion des *M. sphincter pupillae* und des *M.*

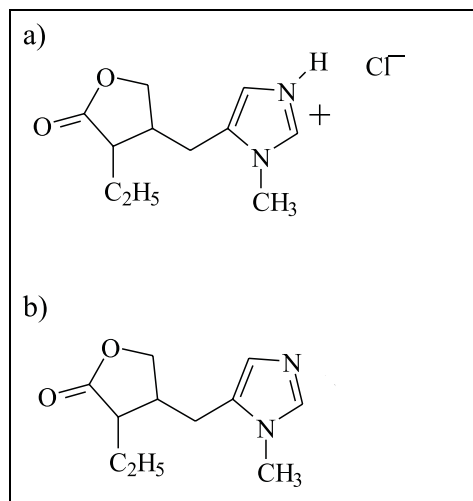


Abbildung 2.21: Strukturformel von Pilocarpin-HCl und Pilocarpin-Base.

*ciliaris* findet eine Miosis statt. Zusätzlich sorgt die Erweiterung der Abflusswege des Kammerwassers für eine Senkung des intraokularen Drucks [111].

Die Arzneistoffkonzentration der im Handel zu findenden Augentropfen liegt bei  $c = 0.5 - 4\%$ . In dieser Arbeit wurden Konzentrationen von  $c = 1 - 4\%$  eingesetzt, die damit im therapeutischen Bereich liegen. PHCl ist – wie die Strukturformel zeigt – komplett hydrophil.

- **Timolol-Hydrogenmaleat** (TM, Abb. 2.22) ist ein  $\beta$ -Rezeptorenblocker zur Senkung des Augeninnendrucks ohne Beeinflussung der Pupillenmotorik oder der Akkomodation [110]. Die Indikation von TM ist vor allem die Therapie des Weitwinkelglaukoms. Der Mechanismus der Senkung des Augeninnendrucks ist noch nicht komplett verstanden, doch gilt als sicher, dass Timolol die Produktion des Kammerwassers herabsetzt [111].

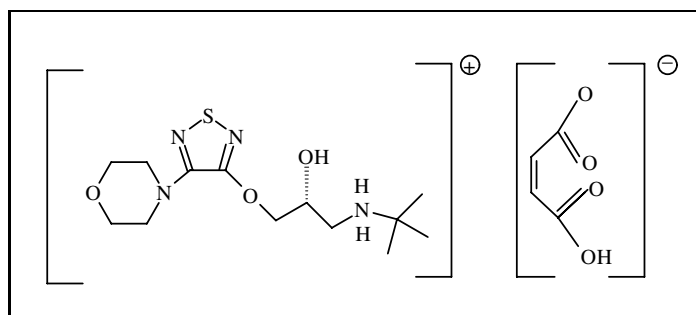


Abbildung 2.22: Strukturformel von Timolol-Hydrogenmaleat (TM).

Im Handel befindliche Arzneiformen enthalten Timolol in Konzentrationen von  $c = 0.1 - 0.5\%$  bzgl. der Timolol-Base [108]. Dies entspricht TM-Konzentrationen

von  $c = 0.14 - 0.68\%$ . Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen sind mit  $c = 0.5 - 5\%$  Timolol-Hydrogenmaleat deutlich höher. Das reine Timolol ist lipophil, während das Hydrogenmaleat eher als hydrophil einzustufen ist, was sich aus der guten Wasserlöslichkeit und dem als sehr gering ermittelten Verteilungskoeffizienten ableitet.

# Kapitel 3

## Experimentelle Methoden

### 3.1 Materialien

Folgende Substanzen wurden für diese Arbeit verwendet:

- **Lecithin**

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lecithin ist Phospholipon<sup>R</sup>90 G, das von der Phospholipid AG (Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Das wachsartige, gelbe Phospholipon<sup>R</sup>90 G ist ein hochgereinigtes angereichertes Sojalecithin [112]. Der Gehalt an Phosphatidylcholin beträgt lt. Hersteller  $93 \pm 3\%$  [113], die weiteren im Phospholipon<sup>R</sup>90 G enthaltenen Substanzen sind im wesentlichen andere Phospholipide und Wasser. Das mittlere Molekulargewicht beträgt nach Herstellerangaben  $M_r \approx 800$ . Die Strukturformel des Phosphatidylcholins ist in Abb. 2.10 abgebildet, das zugehörige Fettsäurespektrum ist in Tabelle 3.1 angegeben [114].

Tabelle 3.1: Fettsäurespektrum von Phosphatidylcholin. Aus [114].

| Fettsäure  | Massenanteil [%] |
|--|------------------|
| Linolsäure (C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> COOH)    | 66.5             |
| Palmitinsäure (C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> COOH) | 12.9             |
| Ölsäure (C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> COOH)       | 10.5             |
| Linolensäure (C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> COOH)  | 5.7              |
| Stearinsäure (C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> COOH)  | 4.4              |

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Chargen von Phospholipon<sup>R</sup>90 G verwendet. Auf die möglichen Auswirkungen der Unterschiede wird in *Kap. 5: Experimentelle Resultate* eingegangen. Das Lecithin wurde ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt. Die Chargen wurden in geschlossenen Behältnissen



im Tiefkühlschrank bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Spezifikationen der Chargen sind in Tab. 3.2 angegeben.

Tabelle 3.2: Chargenspezifikationen des Phospholipon<sup>R</sup>90 G lt. Analysen-Zertifikat des Herstellers.

| Kenngröße              | Ch-Nr. 90050 | Ch-Nr. 90080 |
|------------------------|--------------|--------------|
| Phosphatidylcholin     | 93.5 %       | 92.8 %       |
| Lysophosphatidylcholin | 1.8 %        | 2.7 %        |
| Peroxidzahl            | 2.1          | 1.6          |

### • Isopropylmyristat

Isopropylmyristat (IPM,  $M_r = 270$ ) ist der mit Myristinsäure veresterte Isopropylalkohol. IPM (Abb. 3.1) ist ein farbloses, dünnflüssiges Wachs mit guten Spreitungseigenschaften. Als toxikologisch unbedenkliche lipophile Flüssigkeit dient IPM als Lösungsmittel und Penetrationsförderer in vielen topischen Zubereitungen [115]. Aus diesen Gründen wurde IPM, wie schon in vorangegangenen Arbeiten [10, 15, 18, 41] als Lösungsmittel für die invers mizellaren Lösungen eingesetzt. Das IPM wurde von der Firma Henkel (Düsseldorf) bezogen.

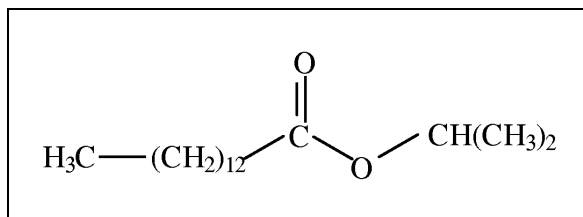


Abbildung 3.1: Strukturformel von Isopropylmyristat (IPM).

### • Dekan

Dekan ( $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ ), Riedel-de Haën (Seelze) wurde anstelle von IPM bei den FTIR-Messungen als lipophiles Lösungsmittel verwendet.

### • Diclofenac-Na

Diclofenac-Natrium (DNa,  $M_r = 318$ ) wurde von der Firma Salutas (Barleben) zur Verfügung gestellt. Es ist ein feines weißes Pulver. Die Strukturformel ist in Abb. 2.20 zu sehen.

### • Pilocarpin-HCl und Pilocarpin-Base

Beide Substanzen waren eine Spende von Dr. Mann Pharma GmbH (Berlin) und sind in Abb. 2.21 als Strukturformel abgebildet. Pilocarpin-HCl (PHCl,  $M_r = 245$ ) ist ein kristallines Salz, während die Base (PBase,  $M_r = 208$ ) eine hochviskose, honigartige farblose Substanz ist.

- **Timolol-Hydrogenmaleat**

Timolol-Hydrogenmaleat (TM, Synonym: Timololmaleat) hat ein Molekulargewicht von  $M_r = 433$ . Das feinkristalline TM (Strukturformel: Abb. 2.22) wurde von Firma Dr. Winzer Pharma GmbH (Olching) zur Verfügung gestellt.

- **Wasser**

Wasser wurde ausschließlich in bidestillierter Qualität verwendet.

- **Natrium-Dodecylsulfat**

Das anionische Tensid Na-Dodecylsulfat (SDS) wurde von der Firma AppliChem (Darmstadt) geliefert.

## 3.2 Methodik : Herstellung der IML-Stammlösung

Zur Herstellung der **IML-Stammlösung** wurde ein beheizbarer Magnetrührer verwendet. Das Lecithin wurde unter Rühren bei  $T \approx 50^\circ\text{C}$  in IPM gelöst, bis sich eine klare gelbe Lösung bildete. Dieser Vorgang dauerte etwa 2-3 Stunden. Anschließend wurden die Systeme bis zum Erkalten weiter gerührt. Die so hergestellten Systeme waren über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen ( $>2$  Jahre) stabil. Die nicht kaltgerührten Systeme hingegen zeigten nach ein paar Tagen ein hellgelbes Präzipitat, das sich durch Röntgenkleinwinkelbeugung bei einem Netzebenenabstand von  $d = 5.4$  nm als kristallines Lecithin herausstellte [103]. Die Konzentration an Lecithin betrug stets 30% (m/m). Die IML-Stammlösung mit 30% Lecithin wird im folgenden als Standard-IML bezeichnet.

**Diclofenac-Na** wurde direkt zu der IML-Stammlösung hinzugegeben. Der Arzneistoff wurde unter Rühren bei  $T \approx 50^\circ\text{C}$  gelöst. Dieser Vorgang dauerte je nach Arzneistoffkonzentration 12-36 h. DNa wurde in Konzentrationen von 2-10% (m/m) hinzugefügt.

**Pilocarpin-HCl** ist als hydrophiler Arzneistoff in lipophilen Medien nicht löslich und lässt sich nicht direkt in die IML einarbeiten. Deshalb wurde der Arzneistoff zuerst in Wasser gelöst. Bei Zugabe der wässrigen Arzneistoff-Stammlösung zur IML-Stammlösung entstand während des Rührens eine Dispersion lamellarer Flüssigkristalle. Durch Erwärmen der Systeme auf  $T \approx 50^\circ\text{C}$  wurde das Wasser unter Rühren evaporisiert, bis die Systeme den IML-Stammlösungen optisch ähneln. Das Pilocarpin-HCl kann nur in Konzentrationen bis 4% (m/m) in den Mizellen solubilisiert werden.

**Timolol-Hydrogenmaleat** kann sowohl über eine wässrige Stammlösung im Verhältnis 1:15 mit anschließender Evaporisation des Wassers als auch durch Direktzugabe in die

IML-Stammlösung eingearbeitet werden. Die resultierenden Systeme unterscheiden sich nicht in ihren physiko-chemischen Eigenschaften (s. Kap. 5.1.3). Es wurden Konzentrationen bis zu 5% (m/m) TM hinzugefügt.

**Pilocarpin-Base** wurde den Systemen bis zu 4% Massenanteil direkt hinzugegeben und durch Rühren solubilisiert.

In den meisten Versuchsreihen wurden die physiko-chemischen Eigenschaften der invers miszellaren Lösungen mit 2% Arzneistoff **in Abhängigkeit des Wassergehalts** bestimmt. Nach Zugabe einer bestimmten Menge an Wasser transformieren die IML je nach Wasseranteil zu mehrphasigen Systemen. Genaue Informationen über die Phasenlage der arzneistofffreien Systeme sind bei Hamann und Müller-Goymann [18] zu finden (Abb. 2.17). Arzneistoffe, die über eine wässrige Stammlösung eingearbeitet wurden, wurden gleichzeitig mit dem Wasser der IML-Stammlösung zugegeben. Im Verlaufe einer Versuchsreihe wurde das Wasser durch Evaporisation auf einem Magnetrührer mit Heizplatte aus den Proben entfernt. Während dieses Vorgangs fand die Probenentnahme statt. Der Wassergehalt der jeweiligen Proben wurde mit Karl-Fischer-Titration ermittelt, so dass für jede Probe der exakte Wassergehalt angegeben werden konnte. Damit wurden Fehlerquellen bei der Wasserzugabe wie z.B. die Nichtberücksichtigung des Restwassergehalts der IML-Stammlösung ausgeschaltet. Mittels einer Thermogravimetrie(TG)-Untersuchung der Systeme wurde überprüft, ob neben Wasser auch IPM evaporisiert. Das Ergebnis zeigte eine Evaporisationsrate von  $v_{IPM} = 0.06 \pm 0.01\%$  pro Stunde bei  $T = 50^\circ\text{C}$ . Über den gesamten Versuchsablauf bedeutet dies einen Verlust von weniger als 1.5% IPM, der im Vergleich zu anderen Fehlerquellen als unbedeutend betrachtet werden kann. Eine *in situ*-Kontrolle des Versuchsprinzips durch Nachwiegen ergab, dass die realen Verluste von IPM unter Versuchsbedingungen deutlich niedriger ausfallen als bei der TG-Untersuchung festgestellt.

Durch die Zugabe von Arzneistoffen bzw. Wasser verändern sich die absoluten Massenanteile von Lecithin und IPM, was in den Arbeiten von Papantoniou [107] und Friedrich [116] besonders hervorgehoben wurde. Diese Berechnung ist wichtig, um molare Verhältnisse angeben zu können. Beide Autoren vernachlässigten jedoch den Wasseranteil völlig, so dass die angegebenen Lecithin- und IPM-Anteile nicht genau mit den wahren Werten übereinstimmen können. In dieser Arbeit sind deshalb immer nur die Massenanteile von Wasser und Arzneistoff angegeben, die sich immer auf eine IML-Stammlösung (Lecithin:IPM) 30:70 beziehen. Molare Verhältnisse können aus diesen Angaben berechnet werden.

Für die Partikelgrößenbestimmung mit SAXS und PCS mussten die IML 1:15 mit IPM verdünnt werden, um interpartikuläre Wechselwirkungen auszuschließen. Das Verhältnis (Lecithin:IPM) verändert sich dadurch zu 2:98. Die Angaben von Arzneistoff- und Wasserkonzentration beziehen sich aber weiterhin auf die 30:70-Stammlösung.

### 3.3 Verwendete Methoden und Geräte

#### 3.3.1 Röntgenstrukturanalyse

##### 3.3.1.1 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Zur Messung der Röntgenkleinwinkelstreuung diente eine Kratky-Kompakt Kamera KCLC mit einem durch eine Peltier-Einrichtung temperierbaren Küvettenhalter (Anton Paar, Graz, Österreich). Als Röntgenquelle wurde eine Breitfokus-Röntgenröhre mit Cu-Anode PW 2253/11 Kratky (Philips, Almelo, Niederlande) verwendet. Ein PW 1830 Röntgengenerator (Philips) lieferte die nötige Hochspannung. Ein interner Nickelfilter eliminierte die  $K_{\beta}$ -Linie. Es resultierte eine zur Strukturanalyse notwendige monochromatische Strahlung ( $K_{\alpha}$ -Linie;  $\lambda = 0,1542$  nm). Die Bremsstrahlung wurde vernachlässigt [117].

Die winkelabhängige Streuintensität wurde mit einem ortsempfindlichen Detektor OED-50 M (MBraun, Garching), Zählgas Argon-Methan, aufgenommen. Anschließend wurden die Signale mit dem Vielkanalanalysator ADC mit A/D-Wandler (MBraun) weiterverarbeitet und an einen Messcomputer weitergeleitet, auf dem sie dann mit der Software MCD 1.90 (MBraun) aufgezeichnet wurden. Die Streuintensitäten wurden nach Kanal-Nr. sortiert als ASCII-File ausgegeben, das dann mit eigens erstellten Pascal-Routinen in ein vom Auswertungsprogramm PDH/ITP-92 (Anton Paar) lesbares Format umgewandelt wurde.

Die Generatorleistung wurde der Streuintensität angepasst. Zu hohe Intensitäten können den Detektor überlasten und für verzerrte Streukurven sorgen. Diffuse Kleinwinkelstreukurven liefern dann kein korrektes Ergebnis, was durch Kalibrierungsmessungen bestätigt werden konnte. Für die Kleinwinkelbeugung ist dieser Effekt nicht so relevant, da die Positionen der Intensitätsmaxima von diesen Verzerrungen nicht wesentlich beeinflusst werden. Aus diesen Gründen wurden Röhrenspannung und -strom so eingestellt, dass die Totzeit des Detektors bei ausreichender Streuintensität möglichst gering war. Die Cu- $K_{\alpha}$ -Linie hat eine Energie von ca. 8 keV, so dass die niedrigste eingesetzte Hochspannung von  $U = 25$  kV zur Erzeugung dieser Linie deutlich ausreichte.

Alle Messungen fanden bei  $T = 25^\circ\text{C}$  statt. Die Messdauer betrug für SAXS-Messungen 3600 s, für SAXD-Untersuchungen 600 s. Zur Vermeidung von störender Streuung an Gasmolekülen wurde die Kamera evakuiert. Durch die experimentelle Anordnung wurde als größte auflösbare Struktur  $D_{\text{max}} = 18\text{ nm}$  angenommen.

SAXS-Messungen an inversen Lecithin-Spaghettimizellen sind in der Literatur selten zu finden. Hamann gibt Elektronenabstandsfunktionen für inverse Lecithin/IPM-Systeme an, eine Beschränkung auf den Zylinderquerschnitt findet in dieser Arbeit allerdings nicht statt [103]. Eine Untersuchung des mizellaren Querschnitts – durchgeführt mit Neutronen-Kleinwinkelstreuung – ist für Lecithin/Cyclohexan-Mizellen bei Schurtenberger et al. zu finden [90]. Weitere Kleinwinkelstreuungs-Untersuchungen beschränken sich auf Interpretationen der Streukurven [88, 92, 118].

Der Röntgenkleinwinkelstreuung ist in dieser Arbeit ein eigenes Kapitel gewidmet (s. Kap. 4). Weitere Erläuterungen dieser Methode sind dort zu finden.

### 3.3.1.2 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

SAXD-Untersuchungen, für die nicht die Kratky-Kamera (s.o.) eingesetzt wurde, wurden in einer Lochblenden-Kamera nach Kiessig (Institutseigenbau) durchgeführt. Als Röntgenquelle diente hier eine Feinfokus-Röntgenröhre PW 2213-25 mit Cu-Anode, die von einem Röntgengenerator PW 1710 (beides Philips) mit einer Spannung von  $U = 40\text{ kV}$  und einem Strom von  $I = 25\text{ mA}$  versorgt wurde. Die Beugungsbilder wurden mit einer OED-50M mit ASA-SAX-Karte aufgenommen. Die Datenausgabe erfolgte über die Software ASA (alles MBraun). Zur Verhinderung von Störstreuung wurde die Messkammer evakuiert. Alle Proben wurden in speziell konstruierte Probenträger eingefüllt (Institutseigenbau). Die Berechnung der Netzebenenabstände erfolgte über die Bragg'sche Beziehung (s. Kap. 4.6).

### 3.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Messungen wurden mit einem ZetaSizer 3 (Malvern Instruments, Malvern, Großbritannien) durchgeführt [119]. Ein externer He-Ne-Laser Model 127 (Spectra Physics, Mt. View, California, USA) mit 35 mW Leistung sorgte für eine ausreichend hohe Lichtintensität. Die Proben befanden sich in Einweg-Glasröhrchen Pyrocontrol (Acila, Mörfelden-Walldorf) in einem auf  $T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$  temperierten Wasserbad. Die Streuintensität wurde in einem Winkel von  $90^\circ$  zum Eingangsstrahl mit einem Photomultiplier aufgenommen. Die Messung einer Probe bestand aus 10 Einzelmessungen à 12 s Messzeit. Zur Berech-

nung der Partikelgröße wurde die Kumulantenmethode verwendet, wobei jeweils nur die Besten der ausgeführten 10 Einzelmessungen für die Auswertung durch das Messprogramm berücksichtigt wurden. Da die in Kap. 3.2 beschriebenen Systeme für eine Partikelgrößenbestimmung nicht geeignet waren, mussten sie vorher behandelt werden [15].

1. Bei einer Lecithin-Konzentration von 30% wird die Diffusion der Mizellen durch interpartikuläre Wechselwirkungen behindert. Um diesen Effekt zu verhindern, wurden die Systeme mit IPM 1:15 auf eine Konzentration von 2% (m/m) verdünnt.
2. Die so erhaltenen Systeme erwiesen sich als äußerst polydispers, was sowohl auf Verunreinigungen als auch auf das Vorhandensein vergleichsweise großer Partikel schließen lässt. Da diese Messungen nur schwer reproduzierbar waren, wurden die Systeme vor der Messung durch einen Celluloseacetat-Filter mit Porendurchmesser  $0.2 \mu\text{m}$  (Sartorius AG, Göttingen) gefiltert. Durch das Filtern erhält man im Mittel kleinere Partikel und eine schmalere Verteilung als bei den ungefilterten Systemen; bei Lagerung von 30 Tagen gleicht sich die Verteilungen der ungefilterten Systeme der der gefilterten Systeme an.

### Zur Theorie der Photonenkorrelationsspektroskopie

Mit der PCS wird die Diffusion von Partikeln in einer Dispersion bzw. Suspension über die zeitliche Veränderung des Streubildes gemessen. Die Partikelgröße befindet sich dabei im Bereich der Mie- oder Rayleigh-Streuung, d.h. in der Größenordnung der eingesetzten Wellenlänge oder kleiner [120, 121]. Einfallendes Licht versetzt die Elektronen von Molekülen oder Kleinstpartikeln in Schwingung; die Moleküle verhalten sich dann wie schwingende Dipole, die ihrerseits wiederum Licht derselben Frequenz abstrahlen. Dieser Effekt sorgt für ein Streubild der Suspension, dessen zeitliche Veränderung um so größer ist, je höher die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel ist. Messgröße der PCS ist die *Autokorrelationsfunktion* [121–124]:

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^{+T} I(t)I(t+\tau)dt \quad (3.1)$$

Anschaulich betrachtet gibt  $G(\tau)$  die Übereinstimmung der Streuintensität  $I(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  mit der zum Zeitpunkt  $t + \tau$  an. Bei einer hohen Diffusionsgeschwindigkeit klingt  $G(\tau)$  schnell, bei einer niedrigen langsam ab. Für monodisperse Partikel ist die Autokorrelationsfunktion eine abklingende Exponentialfunktion [121, 123, 124]:

$$G(\tau) = \exp(-2Dh^2\tau) \quad (3.2)$$

wobei  $D$  die Fick'sche Diffusionskonstante und  $h$  der Streuvektor ist. Durch Logarithmierung der Autokorrelationsfunktion kann aus der Steigung von  $G(\tau)$  der Diffusionskoeffizient  $D$  berechnet werden. Hieraus errechnet sich durch

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \quad (3.3)$$

der hydrodynamische Durchmesser  $d$  der Partikel.  $T$  stellt die Temperatur und  $\eta$  die Viskosität des Dispersionsmediums dar. Der Parameter  $d$  gibt den Durchmesser eines isometrischen Partikels mit gleicher Diffusionsgeschwindigkeit an.

Da invers mizellare Lösungen allgemein als polydispers angenommen werden, ist die Autokorrelationsfunktion dieser polydispersen Systeme eine Zusammensetzung aus den Einzelfunktionen jeder Partikelgröße [123]. Die Logarithmierung der Autokorrelationsfunktion gibt nun ein Polynom, dessen linearer Term die mittlere Partikelgröße – den *z-average* – und der quadratische Term den *Polydispersitätsindex*, der die Breite der Verteilung charakterisiert, angibt [121]. Mit diesen beiden Parametern erhält man eine grobe Beschreibung der Partikelgrößenverteilung der Systeme. Eine weitaus ausführlichere Angabe der Verteilung liefert die *exponential sampling*-Methode [125, 126]. Diese Methode hat den Vorteil, dass sich intensitätsgewichtete Verteilungen in anzahlgewichtete umrechnen lassen, was gerade für polydisperse Systeme von Vorteil ist, wenn man berücksichtigt, dass die Streuintensität mit  $d^6$  zunimmt. Da sich die Verteilungen aber nur schwer reproduzieren lassen, wurde als Ergebnis aus den PCS-Messungen der *z-average* als Kenngröße für die Ausmaße der Mizellen verwendet.

Die Resultate wurden jedoch nur qualitativ interpretiert, da es eine Vielzahl von möglichen Fehlerquellen gibt:

- Da es sich um flexible, lange zylindrische Mizellen handelt, ist die Angabe des hydrodynamischen Radius sehr ungenau. Zur Ermittlung weiterer Informationen wie z.B. der Länge des Zylinders müsste der depolarisierte Anteil des Streulichts untersucht werden [127], was mit dem verwendeten Messaufbau nicht möglich war.
- Durch den Prozess der Filterung kann es zu Veränderungen des Systems kommen, so dass selbst eine genaue Angabe der Partikelgrößenverteilung nicht die wahren Eigenschaften des Systems beschreiben würde.
- Die Verdünnung der Systeme beeinflusst ebenfalls die Partikelgrößenverteilung. Verdünnte Systeme weisen demnach größere Assoziate auf [92, 128].
- Beim *z-average* handelt es sich um einen intensitätsgewichteten Mittelwert. Da die Streuintensität der Partikel mit deren Durchmesser  $d$  in der 6. Potenz zunimmt ( $I \propto$

$d^6$ ), ist dieser Mittelwert bei polydispersen Systemen stark zu großen Partikeln hin verschoben.

- Die Asymmetrie der Partikel bedingt selbst bei einheitlichen Zylindern polydisperse Verteilungen.

Während PCS für die relativ isometrischen inversen Aerosol-OT-Mizellen Standardverfahren zur Größenbestimmung ist [31], sind PCS-Untersuchungen für die langen, zylindrischen Lecithin-Mizellen wegen der oben genannten Probleme nur selten in der Literatur zu finden [15, 17, 128], wobei die ersten beiden Arbeiten nur die wasserfreien, eher kurzen Lecithin-Assoziate berücksichtigten.

### 3.3.3 Thermogravimetrie

Thermogravimetrische Messungen wurden mit einer TG/DTA 220 (Seiko, Tokyo, Japan) durchgeführt. Die Proben wurden in offene Aluminiumtiegel eingewogen und über einen Zeitraum von 24 h bei einer Temperatur von  $T = 50^\circ\text{C}$  isotherm gehalten. Die Messungen wurden gegen leere Referenztiegel durchgeführt.

### 3.3.4 Karl-Fischer-Titration (Bestimmung des Wassergehalts)

Die Bestimmung des Wassergehalts der Proben fand nach der Karl-Fischer-Methode mit einem 701 KF Titrino Stand (Metrohm, Herisau, Schweiz) statt. Eine definierte Masse der Probe wurde dazu in Methanol gelöst und mit Hydranal-Composite (Riedel-de Haën, Seelze), das aus Imidazol,  $\text{SO}_2$  und Iod besteht, titriert. Die Redox-Reaktion



(B : Imidazol) findet solange statt, bis das Wasser komplett verbraucht ist. Der Titrationsendpunkt ist bei Iod-Überschuss erreicht. Dieser Punkt wird durch eine potentiometrische Endpunktserkennung erfasst [129]. Aus der Masse der Probe und dem Volumen an Hydranal wurde der Wassergehalt elektronisch berechnet. Vor jeder Messreihe wurde die Titrationseinrichtung mit Hydranal Water Standard 10.0 (Riedel-de Haën) kalibriert.

### 3.3.5 Spektroskopische Methoden

#### 3.3.5.1 $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie-Untersuchungen wurden mit einem Bruker DRX 200 NMR-Spektrometer (Bruker GmbH, Rheinstetten) durchgeführt. Als Probenhalter dienten Wilmad NMR-Röhrchen (RototecSpintec GmbH, Darmstadt), in die die 30%igen



Lecithin-IML mit einem Plastikschauch eingespritzt wurden. Wegen der teilweise sehr hohen Viskosität der Systeme wurden diese vor der Befüllung der Röhrchen auf etwa 50°C erhitzt. Die Locksubstanz D<sub>2</sub>O wurde, um Wechselwirkungen mit den Systemen zu vermeiden, in Glaskapillaren eingeschmolzen und der Probe hinzugefügt. Nach etwa 24 h Lagerung waren sämtliche Luftblasen aus den Systemen verschwunden. Als externer Standard für die <sup>31</sup>P-NMR diente 85%ige Phosphorsäure. Hochfeldverschiebungen sind relativ zum Standard mit negativem, Tieffeldverschiebungen mit positivem Vorzeichen angegeben.

Mit der <sup>31</sup>P-NMR können Interaktionen von Fremdmolekülen oder Lösungsmitteln mit der Phosphatgruppe des Lecithins untersucht werden. Eine Veränderung der Elektronenstruktur um den P-Kern induziert eine chemische Verschiebung  $\delta$ , während eine Einschränkung der Beweglichkeit des P-Kerns die Halbwertsbreite  $\nu_{1/2}$  des Resonanzpeaks vergrößert. Die chemische Verschiebung setzt sich aus drei Beiträgen zusammen [19]:

1. Der *lokale Beitrag* resultiert aus der Elektronenkonfiguration des Phosphoratoms.
2. Der *molekulare Beitrag* hat seine Ursache in benachbarten Atomgruppen des Moleküls.
3. Der *Solvensbeitrag* kommt durch Wechselwirkungen des Lösungsmittels oder anderer Moleküle mit dem betreffenden Molekül zustande.

Da das Lecithinmolekül als ganzes unverändert bleibt, ist der erste Term unbedeutend. Der zweite Term kann einen geringen Einfluss haben, wenn sich die Konformation der polaren Kopfgruppe des Lecithins ändert. Wesentlich für die Untersuchungen der Wechselwirkungen in inversen Mizellen ist hauptsächlich der letzte Term. Die daraus resultierenden Verschiebungen sind jedoch nur sehr klein im Vergleich zur Peakbreite, weshalb ein besonderes Augenmerk auf die Auswertung der Spektren gelegt werden muss. Die chemische Verschiebung wurde deshalb bisher nur in wenigen Arbeiten zur Charakterisierung inverser Mizellen herangezogen. Papantoniou und Schneeweis [17, 107] untersuchten die Solubilisation von Arzneistoffen in inversen Mizellen, während Peng und Luisi [130] die Ionisation der Phosphatgruppe bei verändertem pH-Wert des solubilisierten Wassers beobachteten.

Die Halbwertsbreite als Maß für die Beweglichkeit der Phosphatgruppe des Lecithins dagegen war Gegenstand mehrerer Studien mit dem Ziel, die Hydratation der Phosphatgruppe in Abhängigkeit des Wassergehalts zu quantifizieren [74, 75, 83]. Rillmann bestimmte mittels <sup>31</sup>P-NMR die Wechselwirkung des synthetischen Hostaphat KL340 N

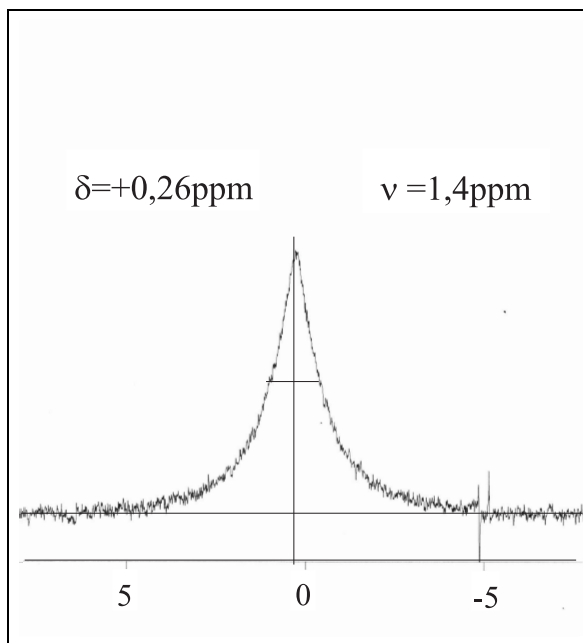


Abbildung 3.2: Beispiel für die Auswertung der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren mit einem Grafikprogramm.

mit Wasser und Cholesterol in inversen Mizellen [31].

Sowohl Halbwertsbreite als auch chemische Verschiebung des  $^{31}\text{P}$ -Signals wurden in dieser Arbeit betrachtet. Da den teilweise sehr breiten Resonanzpeaks ein nicht unerhebliches Rauschen überlagert ist, liefert der in den Spektren angegebene Wert für  $\delta$  nicht den wahren Maximalwert, sondern eine statistische, durch das Rauschen verursachte Spitze. Da die Originaldaten nicht verfügbar waren, wurden die ausgedruckten Spektren gescant und mit einem Grafikprogramm stark vergrößert (Abb. 3.2). Der Maximalwert der Signale kann so wesentlich genauer abgelesen werden. Ebenfalls feststellbar ist auf diese Weise eine mögliche Anisotropie des Signals, die auf eine Restriktion der Beweglichkeit der Lecithinmoleküle in bestimmte Raumrichtungen und damit auf das Vorliegen flüssigkristalliner Strukturen hindeutet [131].

### 3.3.5.2 Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Als Messgerät für die Fourier-Transformierte Infrarot-Spektroskopie (FTIR) diente ein Mattson Genesis FTIR-Spektrometer (Mattson ATI Instruments, Madison, Wisconsin, USA). Die 30%igen Lecithin-IML wurden als Film zwischen zwei NaCl-Fenster aufgetragen und in die Messkammer eingebracht. Als Referenzstrahl diente ein 1 mW He-Ne Laser ( $\lambda=632,8$  nm). Pro Messung wurden 90 Scans durchgeführt; der Mittelwert aus diesen Scans ergab das IR-Spektrum der Probe. Weil IPM im interessanten Absorptionsbereich selbst sehr stark absorbiert, sind die Einflüsse der Signalverschie-

bungen des Lecithins für die invers mizellaren Lösungen Lecithin:IPM 30:70 nicht auflösbar. Um diesen Effekt zu umgehen, wurde das IPM durch Dekan ersetzt. Durch  $^{31}\text{P}$ -NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die chemischen Verschiebungen durch Hinzufügen von Arzneistoff bzw. Wasser zu IML mit Dekan und IPM qualitativ gleichwertig sind. Es kann somit von gleichartigen Wechselwirkungen zwischen Lecithin und den hinzugegebenen Substanzen ausgegangen werden. Die aus den Messungen mit Dekan erhaltenen Ergebnisse wurden qualitativ auf die IPM-Systeme übertragen.

Mittels der FTIR-Spektroskopie wurden die Wechselwirkungen von Fremdmolekülen wie Arzneistoffen und Wasser auf die funktionellen Gruppen des Lecithins untersucht. Ausgewertet wurden Signale, die den Schwingungen der Phosphat-, Carbonyl- und Trimethylammoniumgruppe des Lecithins zuzuordnen sind [132]. Eine Verschiebung des Absorptionssignals zu kleinen Wellenzahlen  $\nu$  lässt auf eine Wechselwirkung der betreffenden funktionellen Gruppe mit dem Fremdmolekül schließen [133]. Die Wechselwirkungen der inversen Lecithin-Mizellen mit Wasser wurden bereits in mehreren Arbeiten mit dieser Methode untersucht, so dass Vergleichsresultate vorliegen [84, 134].

### 3.3.6 Mikroskopische Methoden

#### 3.3.6.1 Polarisationsmikroskopie

Zur optischen Darstellung von Strukturen und Texturen der untersuchten Systeme wurde ein Photomikroskop Typ III (Zeiss, Oberkochen) eingesetzt. Optisch abzubildende Strukturen wie Emulsionströpfchen wurden unter 400facher Vergrößerung aufgenommen. Zur Abbildung von Texturen dienten zwei gekreuzte Polarisatoren, die bei einer optischen Anisotropie der Probe einen bestimmten Anteil des Lichts passieren lassen, wodurch die Texturerscheinungen entstehen. Durch den Einsatz eines  $\lambda$ -Plättchens mit einem Gangunterschied von  $\lambda = 550 \text{ nm}$  können die Texturen farbig dargestellt werden. Zur fotografischen Aufnahme der Bilder wurden Kodak Ektachrome Farbumkehrfilme (160 ISO) verwendet.

#### 3.3.6.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Substanzen wurden zwischen zwei Goldträgern als Sandwich fixiert. Durch Einbringen in schmelzendes  $\text{N}_2$  mit  $T = 63 \text{ K}$  wurden die Proben bei einer Abkühlrate von mehr als  $10^4 \text{ K/s}$  schockgefroren. Mit dieser Methode kann die kolloidale Struktur der Proben fixiert werden. Im Rezipienten der Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers GmbH, Wiesbaden) wurden die Proben unter sehr niedrigem Druck ( $p = 5 \cdot 10^{-2} \text{ Pa}$ ) bei einer Temperatur von  $T = 173 \text{ K}$  gebrochen. Die Bruchflächen wurden anschließend

mit einem Pt/C-Gemisch unter einem Winkel von  $45^\circ$  beschattet (2 nm Schichtdicke) und anschließend senkrecht zur Bruchfläche mit einer 20 nm dicken Kohleschicht bedampft. Nach Ablösen der Replika wurden diese mit einem Chloroform-Methanol 1:1-Gemisch und mit Wasser gereinigt. Eine genauere Beschreibung der Probenpräparation ist bei Müller-Goymann zu finden [99]. Abgebildet wurden diese Replika in einem Transmissions-Elektronenmikroskop EM 300 (Philips, Kassel) bei einer Beschleunigungsspannung von  $U = 80$  kV. Als Filmmaterial diente Kodak Scienta 23D 56 P3.

Müller-Goymann konnte verschiedenste flüssigkristalline Phasen mit TEM darstellen [99]. Die Abbildung inverser Mizellen ist jedoch bisher nur selten gelungen. Arbeiten von Gupta et al., denen Kryo-TEM-Studien an inversen Lecithin-Mizellen gelangen [118], sowie von Kumar et al., die sphäroide und zylindrische inverse Lecithin-Mizellen über eine *negative staining*-Probenpräparation mit dem TEM darstellen konnten [48], verdeutlichen, dass das Problem vermutlich an der Gefrierbruchtechnik liegt.

### 3.3.7 Molecular Modelling

Für die Darstellung der Raumgeometrie der Moleküle wurden Kraftfeldberechnungen mit dem Hyperchem Software Paket Version 4.5 (Hypercube Inc., Waterloo, Kanada) durchgeführt. Als Berechnungsgrundlage wurde das Kraftfeld-Verfahren *MM+* gewählt [135]. Dieses Verfahren beruht auf einem molekülmechanischen Modell, bei dem die Atome durch Massepunkte und die Bindungen durch elastische, gewichtslose Federn dargestellt werden [31]. Aus mehreren Anfangsbedingungen wurden jeweils Konfigurationen möglichst niedriger Energien mit dem Polak-Ribière-Optimierungsalgorithmus berechnet. Als Abbruchbedingung für dieses iterative Verfahren wurde ein RMS-Gradient von  $0,1 \text{ kcal} \cdot \text{\AA}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  eingestellt. Aus der Raumgeometrie der Moleküle können schließlich die Ausdehnungen der polaren und der unpolaren Molekülteile gewonnen werden.

# Kapitel 4

## Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Streuung und Beugung von Röntgenstrahlen zu kleinen Winkeln dient der Aufklärung von Strukturen kolloidaler Dimensionen. Dieser Effekt wird mit Röntgenkleinwinkelstreuung oder üblicherweise mit dem englischen Begriff *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS) bezeichnet und seit ca. 1940 quantitativ genutzt [136, 137].

Die Grundlagen der Röntgenkleinwinkelstreuung sind am Beispiel kolloidaler Assoziate in diesem Kapitel dargestellt. Für eine umfangreiche theoretische Abhandlung des Themas ist auf Guinier und Fournet zu verweisen [138]. Weitere ausführliche Abhandlungen, die auch Anwendungsbeispiele umfassen, geben Kratky [139] sowie Glatter und Kratky [140].

### 4.1 Grundlagen der Röntgenkleinwinkelstreuung

Treffen Röntgenstrahlen auf eine Probe, werden sie an den Elektronen der Probe gestreut. Bei diesem Vorgang muss zwischen elastischer Streuung und Compton-Streuung unterschieden werden.

Bei der **elastischen Streuung** werden die Elektronen durch die eintreffende Röntgenstrahlung in Schwingungen versetzt. Die Elektronen senden nun Sekundärwellen mit im Idealfall identischer Energie aus. Diese Sekundärwellen interferieren und bilden auf diese Weise das Streubild.

Die **Compton-Streuung** geht mit einem Energieverlust der Röntgenquanten einher, weil Energie auf das Elektron, das aus der Atomhülle herausgeschlagen wird, übergeht. Aus zwei Gründen kann die Compton-Streuung vernachlässigt werden. Erstens ist das Verhältnis von elastischer Streuung zur Compton-Streuung im Kleinwinkelbereich äußerst gering [120] und zweitens ist der Impulshöhendiskriminator des ortsempfindli-

chen Detektors so gesetzt, dass Quanten, die eine von der Eingangsstrahlung deutlich verschiedene Energie haben, diskriminiert werden.

Die elastische Streuung von Röntgenstrahlen an Elektronen kann mit Hilfe der klassischen Physik beschrieben werden. Die von den Elektronen ausgesendeten Sekundärwellen überlagern sich zur Streuamplitude des gesamten Systems. Die Intensität, die von einem einzelnen Elektron gestreut wird, hängt nach der Thompson-Formel vom Streuwinkel  $2\vartheta$  ab.

$$I_e(2\vartheta) = I_0 \cdot \frac{r_e}{a^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\vartheta}{2} \quad (4.1)$$

$I_0$  entspricht der Primärstrahlintensität,  $a$  ist der Abstand Probe – Detektor und  $r_e$  ist der klassische Elektronenradius. Wie man aus (4.1) erkennt, kann der Polarisationsfaktor  $(1 + \cos^2 2\vartheta)/2$  für kleine Streuwinkel  $2\vartheta$  gleich 1 gesetzt werden. Somit kann die Streuintensität  $I_e$  eines Elektrons im Falle der Kleinwinkelstreuung durch eine Konstante beschrieben werden.

#### 4.1.1 Das Prinzip der Röntgenkleinwinkelstreuung

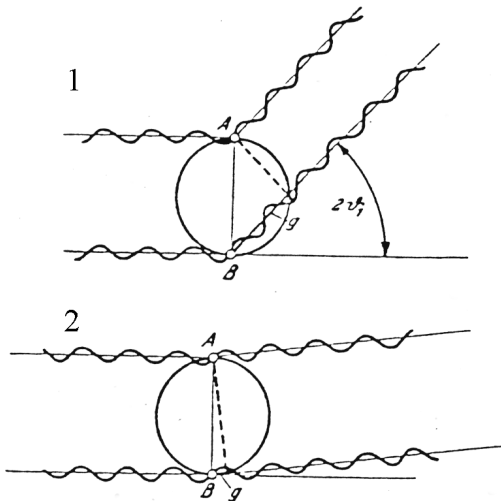


Abbildung 4.1: Röntgenstreuung an zwei Punkten eines kleinen Partikels (1) zu großen, (2) zu kleinen Winkeln. Aus [141].

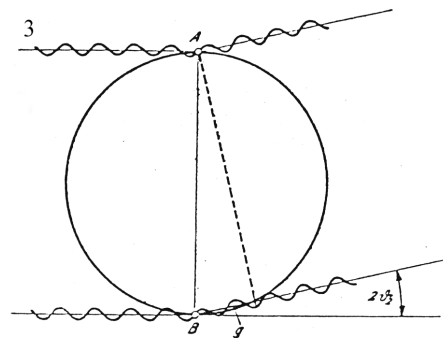


Abbildung 4.2: Röntgenstreuung an zwei Punkten eines großen Partikels. Schon bei sehr kleinen Winkeln treten große Gangunterschiede auf. Aus [141].

Das Prinzip der Röntgenkleinwinkelstreuung sei im folgenden erläutert (Abb. 4.1 und 4.2). Bei sehr kleinen Partikeln, deren Ausmaße in der Größenordnung der Wel-

lenlänge der Röntgenstrahlen liegen, liefert die zufällige Wahl eines Elektronenpaares eine ebenfalls zufällige Phasenbeziehung der beiden Sekundärwellen. Die Folge ist destruktive Interferenz und somit eine weitgehende Auslöschung der Wellen (Abb. 4.1;1). Erst zu kleinen Winkeln  $2\vartheta$  kommt es zu kleinen Gangunterschieden und somit bei Addition zu einer Verstärkung der Intensität. Dies ist das Grundphänomen der Röntgenkleinwinkelstreuung [141] (Abb. 4.1;2).

Sind die Partikel nun sehr groß, so tritt dieses Phänomen bei immer kleineren Winkeln auf (Abb. 4.2). Kolloiddisperse Systeme können mit der Röntgenkleinwinkelstreuung i.a. sehr gut charakterisiert werden. Bei größeren Partikeln tritt das Problem auf, dass die Streuung wegen der zu kleinen Winkel apparativ nicht mehr fassbar ist (s. Kap. 3.3.1). Mit der in dieser Arbeit verwendeten Apparatur können Elektronenabstände bis zur oberen Grenze  $r = 18 \text{ nm}$  erfasst werden.

#### 4.1.2 Streukurve und Elektronenabstandsverteilung

Interferieren nun die Sekundärwellen mehrerer Elektronen miteinander, so addieren sich für jeden Streuwinkel die Amplituden dieser Wellen unter Berücksichtigung der Phasendifferenz. Als Streuintensität messbar ist das Betragsquadrat der Amplitudensumme, das gegen den Streuwinkel  $2\vartheta$  aufgetragen die *Streukurve* ergibt. Allgemein wird anstelle des Streuwinkels  $2\vartheta$  der Streuvektor  $h$  verwendet:

$$h = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \vartheta \quad (4.2)$$

Der Vorteil der Einführung des Streuvektors liegt darin, dass eine Winkelvariable unabhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  angegeben werden kann, um dadurch Streukurven aus verschiedenen Experimenten miteinander vergleichen zu können [142].

Kommen von zwei Elektronen im Abstand  $r$  ausgesendete Sekundärwellen zur Interferenz, so erhält man unter Berücksichtigung einer beliebigen Orientierung des Elektronenpaares einen Interferenzterm der Form:

$$\frac{\sin(hr)}{hr}$$

Die Annahme einer beliebigen Orientierung ist dann korrekt, wenn keine Vorzugsrichtung im System existiert. Dies ist für alle Lösungen gegeben, in denen Partikel unabhängig voneinander zeitabhängige Bewegungen ausführen. Aus diesem Grund ist diese Annahme

für alle in dieser Arbeit untersuchten mizellaren Systeme korrekt.  
Wie die Bragg'sche Gleichung (s. Kap. 4.6)

$$n\lambda = 2d \sin \vartheta$$

( $n$  : Ordnung des Beugungsmaximums,  $d$  : Netzebenenabstand,  $\vartheta$  : Beugungswinkel) zeigt auch der Interferenzterm eine reziproke Beziehung zwischen der Winkelvariable ( $h$  bzw.  $\vartheta$ ) und der Ausdehnung im Ortsraum ( $r$  bzw.  $d$ ). Die Informationen für große Strukturen sind analog zur Bragg'schen Beziehung bei sehr kleinen Winkeln zu finden, kleine Strukturen werden zu großen Winkeln abgebildet.

Die gesamte Streukurve lässt sich nun als Summe der Interferenzen aller im System vorkommenden Elektronenpaare darstellen:

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(hr)}{hr} dr \quad (4.3)$$

Eine ausführliche Herleitung dieser Beziehung ist in [138] und [140] zu finden. Eine wichtige Rolle in der Röntgenkleinwinkelstreuung spielt die Funktion  $p(r)$ , die sog. *Elektronenabstandsfunktion*. Sie gibt an, wieviele Elektronenpaare es im Abstand von  $r$  bis  $r + dr$  gibt. Die Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$ , die den Ortsraum beschreibt, ist mit der Streukurve über eine Fourier-Transformation verknüpft. Sie hat somit denselben Informationsgehalt wie die Streukurve, die im reziproken Raum definiert ist. Aus dem Ortsraum lassen sich jedoch direkt interpretierbare Parameter viel einfacher gewinnen. Als Beispiel sei hier die maximale Ausdehnung eines Partikels erwähnt: Jenseits dieses Wertes für  $r$  können im System keine Elektronenpaare existieren; die  $p(r)$ -Funktion ist im Idealfall ab hier identisch Null. Aus der Streukurve lässt sich diese Information nicht direkt ablesen.

## 4.2 Kalibrierung der Kratky-Kamera mit SDS-Mizellen

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über Messung und Auswertung von SAXS-Messungen am praktischen Beispiel von wässrigen Natriumdodecylsulfat(SDS)-Mizellen geben. Anschließend folgt die Interpretation der erhaltenen Resultate. Die Messungen an den SDS-Mizellen dienen der Validierung des Messprinzips und der Verlässlichkeit der resultierenden Ergebnisse. SAXS-Messungen an SDS-Mizellen sind vielfach veröffentlicht [143–145] und lassen somit einen Vergleich mit den in dieser Arbeit gemessenen Streukurven und Elektronenabstandsfunktionen zu.



### 4.2.1 Aufbau der Kratky-Kamera

Die Streuexperimente wurden mit einer Kleinwinkel-Kompaktkamera (KCLC) nach Kratky durchgeführt. Die Kamera ist zur Innenansicht ohne Abdeckung in Abb. 4.3 zu sehen. Um Minimalbewegungen zwischen der Kamera und der Röntgenröhre zu verhindern, ist die Kamera vorne auf der Röhre montiert. Der Röntgenstrahl dringt in das Block-Kollimationssystem ein, das in Abb. 4.4 schematisch dargestellt ist. Das Block-Kollimationssystem, das entwickelt wurde, um bei ausreichender Strahlintensität die durch Blenden verursachte parasitäre Strahlung zu minimieren, ist in [146] und [147] ausführlich beschrieben. Weitere Information zur Versuchsanordnung sind in Kap. 3: *Experimentelle Methoden* zu finden.

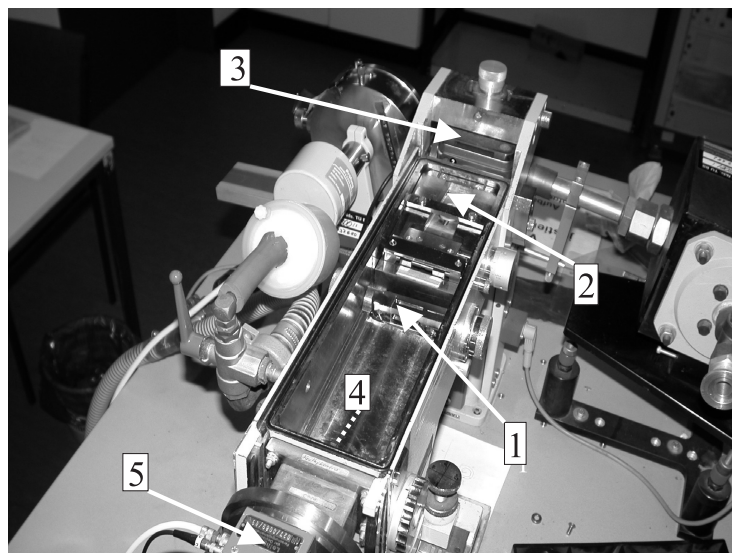


Abbildung 4.3: Innenansicht der Kratky-Kamera (o. Abdeckung). 1: Probenhalter; 2: Block-Kollimationssystem; 3: Röntgenröhre; 4: Primärstrahlfänger (verborgen); 5: ortsempfindlicher Detektor.

In Abb. 4.4 ist der Strahlengang in der Kratky-Kamera zu sehen. Der Röntgenstrahl wird durch das Blocksystem auf ein strichförmiges Strahlprofil kollimiert und trifft so auf die Probe – eine mizellare Lösung von SDS in Wasser. Die Überlagerung der in der Probe entstehenden Sekundärwellen ergibt das abgebildete Streubild, das mit dem ortsempfindlichen Detektor aufgenommen wird. Der Streuwinkel beträgt wegen der Definition Einfallswinkel gleich Reflexionswinkel  $2\vartheta$ . Da der Primärstrahl eine um mehrere Größenordnungen höhere Intensität als das Streubild hat, muss er durch den *Primärstrahlfänger (PSF)* ausgeblendet werden, damit das Streubild aufgelöst werden kann.

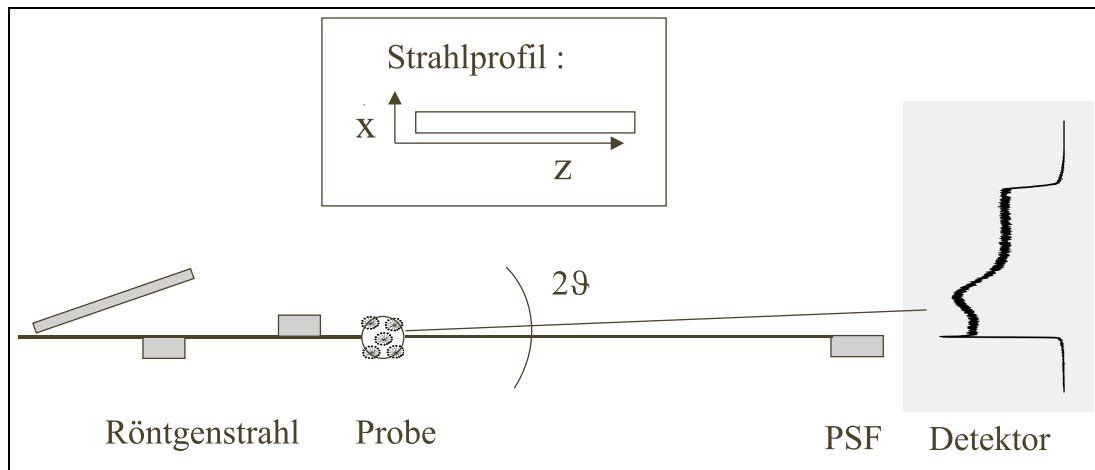


Abbildung 4.4: Schema des Strahlenganges der Kratky-Kamera am Beispiel der Röntgenstreuung an SDS-Mizellen. Kasten: Strahlprofil.

### 4.2.2 Justierung der Kamera

Die vollständige Justierung der Kamera beinhaltet folgende Schritte:

1. Ausrichtung der Kamera relativ zum Fokus der Röntgenquelle.  
Zur optimalen Ausleuchtung des Eintrittsspalts kann die Kamera mit diversen Stellschrauben relativ zur Röntgenröhre verstellt werden. Es wird bei leerer Kamera auf maximale Primärstrahlintensität justiert.
2. Einfüllen der Probe.  
Der Probenhalter besteht aus einer Quarzkapillare (Küvette), die in einen Metallträger eingeklebt ist. In diese Küvette, die vakuumdicht verschlossen werden kann, können sowohl flüssige als auch halbfeste Proben eingefüllt werden. Der Metallträger wird in den Probenhalter eingesetzt. Letzterer muss nun so justiert werden, dass die Kapillare mit der Probe optimal in den Strahlengang platziert ist. Zu diesem Zweck kann der Detektor um  $90^\circ$  gedreht werden. Der Primärstrahl wird jetzt in seiner Längsrichtung aufgenommen. Setzt man zur Justierung eine stark absorbierende Substanz, wie z.B. eine konzentrierte CsCl-Lösung ein, kann die optimale Lage der Kapillare durch die minimale Intensität und die optimale Neigung durch eine möglichst gleichmäßige Intensität des Strahl längsprofils gefunden werden.
3. Justierung des Primärstrahlfängers.  
Der Primärstrahlfänger ist in der Höhe und der Neigung verstellbar. Die Höheneinstellung erfolgte mit einem Lösungsmittel, wie z.B. Wasser oder IPM, als Probe. Mangels Struktur zeigt das Lösungsmittel eine über den kompletten Kleinwinkelbereich konstante Streuintensität. Die Höhe des PSF wird so eingestellt, dass bei sehr kleinen Winkeln der Primärstrahl andeutungsweise zu erkennen ist. Die Form der

Streukurve entspricht dann einer horizontalen Linie, die zu sehr kleinen Streuwinkeln in einen äußerst starken Anstieg durch den nicht vollständig ausgeblendeten Primärstrahl mündet. Die Neigung des PSF wird durch Aufnahme des Strahl längsprofils analog zur Einjustierung der Küvette eingestellt.

#### 4. Aufnahme von Strahl längs- und -weitenprofil.

Nach erfolgter Justierung werden die Strahlprofile  $Q(x)$  (Abb. 4.5) und  $P(z)$  (Abb. 4.6) in  $x$ - und  $z$ -Richtung aufgenommen. Die Messung der direkten Primärstrahlintensität erfolgt in allen Fällen mit der Wanderspaltmethode von Stabinger und Kratky [148]. Der Primärstrahl wird dabei durch einen sich in  $z$ -Richtung bewegendenden vertikalen Spalt abgeschwächt. Die Strahlprofile werden später für die Entschmierung der Streukurven benötigt.

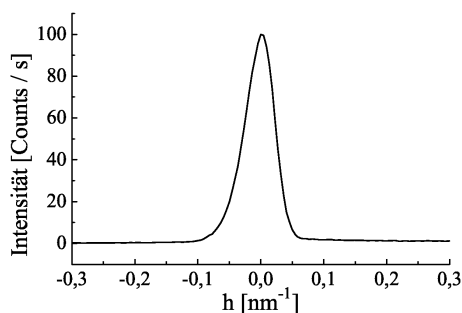


Abbildung 4.5: Strahlweitenprofil  $Q(x)$ .

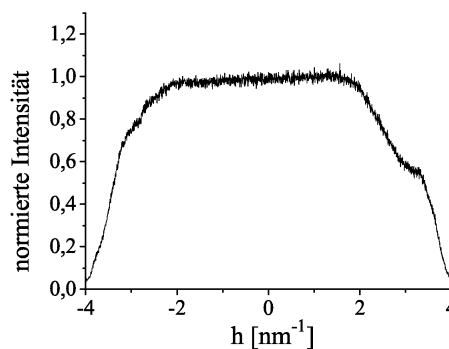


Abbildung 4.6: Strahl längsprofil  $P(z)$  – gemessen mit dem um  $90^\circ$  gedrehten Detektor.

### 4.2.3 Messung an Na-Dodecylsulfat (SDS)-Mizellen

Das anionenaktive Tensid Na-Dodecylsulfat (SDS,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25} - \text{O} - \text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ), auch Na-Laurylsulfat genannt, bildet in Wasser Mizellen aus (Abb. 4.7). Die Mizellgröße ist in der Literatur mit Werten zwischen  $r = 5,9$  und  $6,4 \text{ nm}$  angegeben [143–145]. Es wurden in diesen Quellen jedoch verschiedene SDS-Konzentrationen zwischen 1% und 15% untersucht.

In Abb. 4.7 ist die Struktur einer SDS-Mizelle abgebildet. Das Tensidmolekül besteht aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Molekülrest. In der rechten Grafik bedeuten dunklere Flächen eine höhere Elektronendichte. Die hydrophilen Teile des Tensids weisen eine höhere Elektronendichte als das Lösungsmittel (0.15 m NaCl in Wasser) auf, während die Elektronendichte des aus Kohlenwasserstoffketten bestehenden

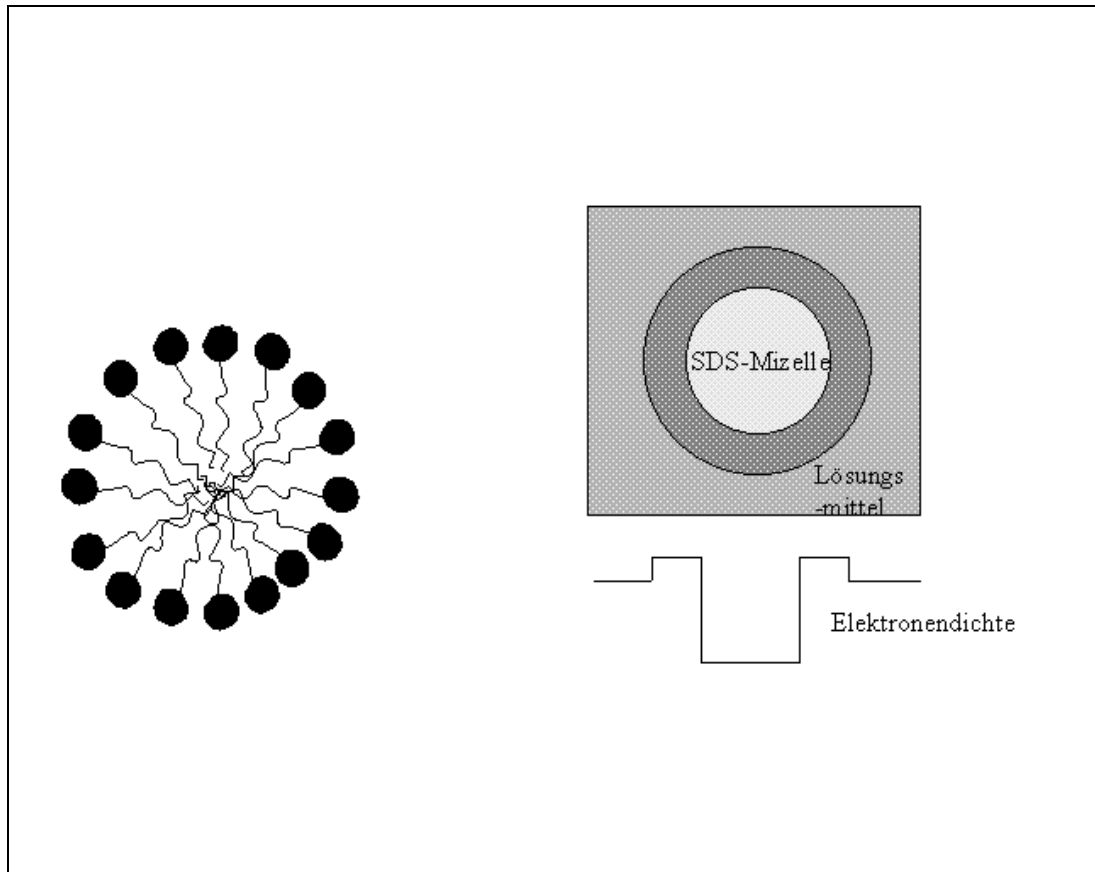


Abbildung 4.7: Struktur und Elektronendichte der SDS-Mizellen. Links: Aufbau der Mizelle. Rechts: Elektronendichteprofil.

lipophilen Innenteils der Mizelle deutlich niedriger ist.

Bisher wurde die Elektronendichte des Lösungsmittels nicht berücksichtigt; in der theoretischen Betrachtung wurde von Partikeln im Vakuum ausgegangen. Reale Lösungsmittel haben dagegen eine konstante Elektronendichte. Da bei der Röntgenstreuung die Elektronen Streuzentren sind, sind nur Orte, die eine von ihrer Umgebung verschiedene Elektronendichte aufweisen, „sichtbar“. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Elektronendichte des Partikels höher oder niedriger als die des Lösungsmittels ist. Die SDS-Mizellen sind in ihrer gesamten Struktur erfassbar, da die hydrophilen Bereiche eine höhere, die lipophilen Bereiche eine niedrigere Elektronendichte als das Lösungsmittel aufweisen.

Um einen Vergleich mit verschiedenen Literaturdaten zu ermöglichen, wurden SDS-Mizellen in Konzentrationen von 1% und 5% SDS untersucht. Zur Herstellung der mizellaren Lösungen wurden 1% bzw. 5% SDS mit einem Magnetrührer im wässrigen Lösungsmittel dispergiert, bis sich der weiße Bodensatz löste. Da nur die Elektronen-

struktur der Mizellen von Interesse ist, wurde die Streuung des Lösungsmittels separat gemessen und von den Streukurven der mizellaren Lösungen subtrahiert.

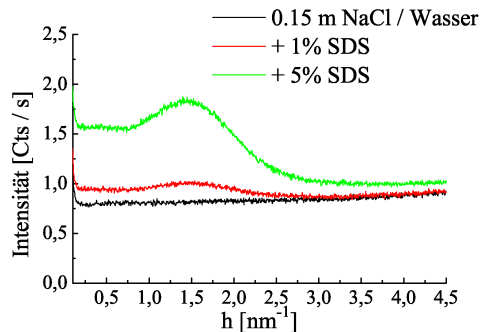


Abbildung 4.8: Streukurven des Lösungsmittels und der mizellaren Lösungen.

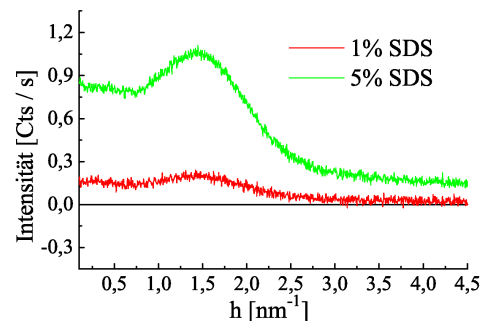


Abbildung 4.9: Streukurven der SDS-Mizellen abzüglich des Lösungsmittels.

Die aus der SAXS resultierenden Streukurven sind in Abb. 4.8 und Abb. 4.9 zu sehen. Man erkennt an der Streukurve des Lösungsmittels einen horizontalen Verlauf mit einem zu kleinen Winkeln starken Anstieg der Intensität, was typisch für unstrukturierte Systeme ist. Die Streukurven der SDS-Mizellen zeigen dagegen eindeutig eine diffuse Streuung im Kleinwinkelbereich.

#### 4.2.4 Bearbeitung der Streukurven

Die Messung und Auswertung der Streukurven erfolgte folgendermaßen:

1. Messung der Primärstrahlposition.

Vor jeder Messreihe wurde die Primärstrahlposition aufgenommen. Sie entspricht dem Streuvektor  $h = 0 \text{ nm}^{-1}$ . Die Umrechnung der Kanal-Nr. des Detektors auf den Streuvektor  $h$  erfolgt nach einer Kalibrierung mit dem kristallinen Cholesterol (Netzebenenabstand  $d = 3.39 \text{ nm}$  [101]) mittels einer eigens erstellten Pascal-Routine.

2. Setzen der Hochspannung des ortsempfindlichen Detektors.

Vor jeder Messung wurde die Hochspannung des Detektors so eingestellt, dass das Maximum der gaussförmigen Energieverteilung bei Kanal 600 liegt. Damit wird sichergestellt, dass für jede Messung im wesentlichen die elastische Streuung der Cu- $K_\alpha$ -Linie aufgenommen wird. Das Energiefenster wurde einmalig zu Beginn der Messungen gesetzt. Seine Grenzen liegen symmetrisch um das Maximum angeordnet bei den Kanälen 400 und 800 [149].

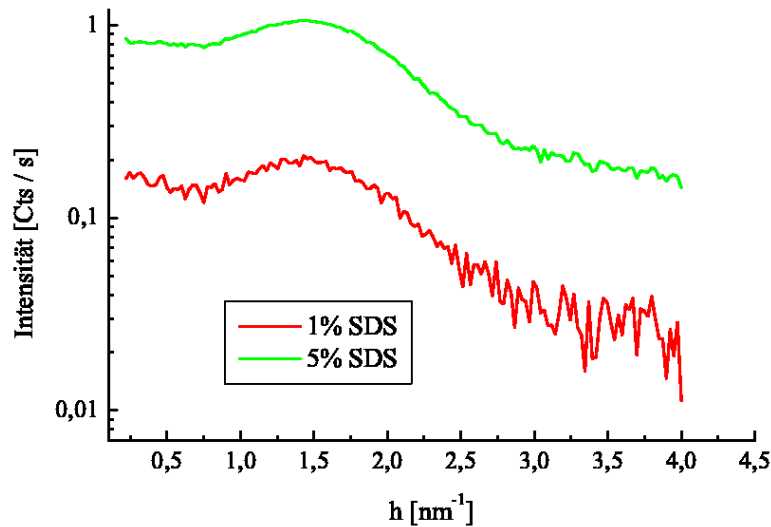


Abbildung 4.10: Geglättete Streukurven; ab hier in der üblichen logarithmischen Darstellung.

### 3. Aufnahme der Streukurve.

Es wurden die Streukurven von Lösungsmittel und Substanz aufgenommen. Die Messzeit betrug im Fall der SDS-Mizellen  $t = 5000$  s. Um Verzerrungen der Streukurve zu verhindern, wurde die Röhrenleistung so eingestellt, dass die Totzeit des Detektors bezogen auf die Messzeit kleiner als 3% ist.

### 4. Subtraktion der Streuung des Lösungsmittels.

Die Streuung des Lösungsmittels  $I_{Lsm}$  wurde anteilsweise von der Streukurve der Probe subtrahiert. Ist  $\phi$  der Volumenanteil der gelösten Substanz, so sieht die Streukurve des Partikels folgendermaßen aus [150]:

$$I(h) = I_{Probe}(h) - (1 - \phi)I_{Lsm}(h) - \phi I_{Kap}(h) \quad (4.4)$$

Wegen der sehr geringen Streuung  $I_{Kap}$  der Quarzkapillare und der ebenfalls geringen Konzentrationen an gelöster Substanz konnte der letzte Term ignoriert werden. Außerdem wurde anstelle des Volumenanteils der Massenanteil eingesetzt. Auch hier ist bei den geringen Konzentrationen der Fehler als gering anzusehen.

### 5. Glätten der Streukurve.

Da der Rechenaufwand für die Auswertung der Streukurven mit zunehmender Anzahl von Datenpunkten stark ansteigt, werden die Streukurven geglättet, d.h. von ursprünglich ca. 1000 auf etwa 200 Datenpunkte reduziert. Das Glätten erfolgt innerhalb des *Primary Data Handling (PDH)*-Programms durch eine Mittelwertbildung benachbarter Werte [151]. Die geglätteten Kurven sind in Abb. 4.10 zu sehen.

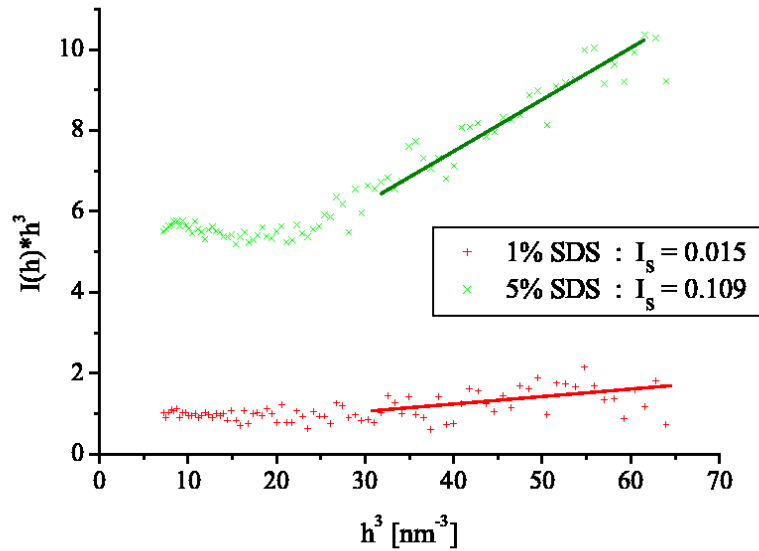


Abbildung 4.11: Bestimmung der Hintergrundstreuung nach Porod.

#### 6. Abzug der Hintergrundstreuung.

Elektronendichteschwankungen innerhalb der Mizellen sorgen dafür, dass die Streukurve nicht exakt nach Porod's Gesetz mit  $h^{-4}$  zu großen Winkeln abfällt [152], sondern einen den Dichteschwankungen proportionalen Offset  $I_S$  zeigt. Dieser Hintergrund- oder Fluktuationsstreuung genannte Anteil ist unabhängig von der Gestalt der Mizellen. Deshalb addiert sich die Hintergrundstreuung  $I_S(h)$  zur Streukurve der Probe. Bei großen Winkeln gilt dann (Die **verschmierte** Streukurve  $\tilde{I}(h)$  fällt mit  $h^{-3}$  ab!) [150]:

$$\tilde{I}(h) = I_S + k \cdot h^{-3} \quad (4.5)$$

Trägt man  $\tilde{I}(h) \cdot h^3$  gegen  $h^3$  auf, so erhält man zu großen Streuwinkeln eine Gerade mit der Steigung  $I_S$  (Abb. 4.11). Dieser Wert ist nun von den Streukurven zu subtrahieren. Dies geschah im Rahmen der Auswertung mit der *Indirekten Fourier-Transformation*.

#### 7. Entschmierung der Streukurve.

Die Theorie der Röntgenstreuung geht stets von einem im Idealfall punktförmigen Strahlquerschnitt aus. Das strichförmige Strahlprofil sorgt für eine *Verschmierung* der resultierenden Streukurven. Das bedeutet soviel, als dass ein auf dem Detektordraht aufgenommener Quant nicht bloß aus dem Mittelpunkt des Strahlquerschnitts, sondern aus jedem beliebigen Punkt der Strahlprofils entspringen kann. Diese Tatsache verdeutlicht Abb. 4.12. Die Überlagerung aller Streuwellen, die im gesamten

Strahlprofil erzeugt werden, führt zu einem Strukturverlust der Streukurven – der Verschmierung.

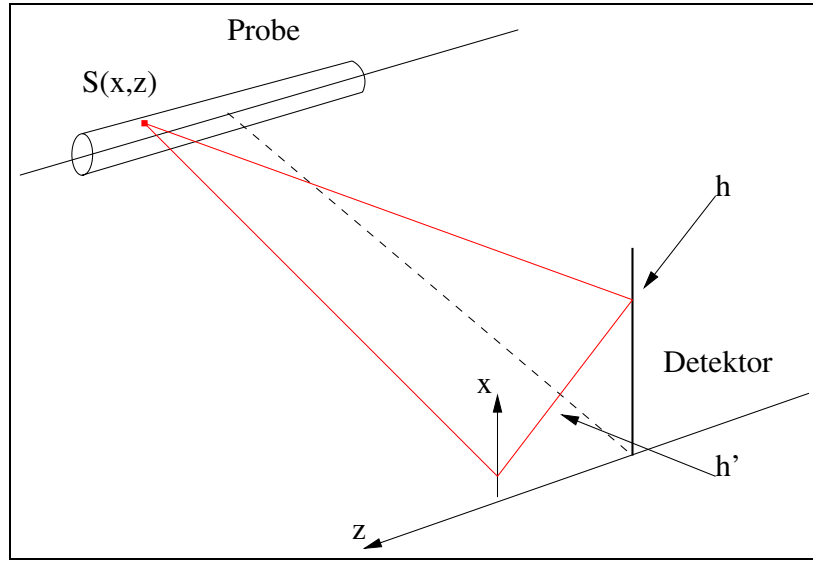


Abbildung 4.12: Geometrie des Verschmierungseffekts.  $h' = \sqrt{(h-x)^2 + z^2}$

Die Streuintensität, die an jedem Punkt  $h$  des Detektors registriert wird, ist also die Summe aller dort auftreffenden Sekundärwellen. Dies verdeutlicht Gl. (4.6) [153]:

$$\tilde{I}(h) = 2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} P(z) Q(x) I \left( \sqrt{(h-x)^2 + z^2} \right) dz dx \quad (4.6)$$

Zur Entschmierung der Streukurven benötigt man die in Abb. 4.5 und 4.6 aufgeführten Strahlprofile. Die Auswerteprogramme verlangen eine begrenzte Anzahl äquidistanter  $h$ -Werte, sog. Stützstellen. Zur Bestimmung dieser Stützstellen wurden mit ORIGIN<sup>R</sup> analytische Funktionen an die Strahlprofile angepasst, und zwar eine Gaussfunktion für das Weiten- und eine Sigmoidalfunktion für das Längenprofil [154]. Die entsprechenden Funktionswerte zu äquidistanten  $h$ -Werten wurden für die Auswertung in Profildateien geschrieben. Wegen der Indirekten Fourier-Transformation erfolgte die Entschmierung der aufgenommenen Streukurven zusammen mit der eigentlichen Auswertung. Die entschmierten Streukurven der SDS-Mizellen sind in Abb. 4.13 zu sehen; sie zeigen deutlich ausgeprägtere Strukturen als die verschmierten Streukurven.

#### 8. Indirekte Fourier-Transformation

Die entschmierte Streukurve  $I(h)$  ist durch Gl. (4.3) mit der Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  aus dem Ortsraum verknüpft.



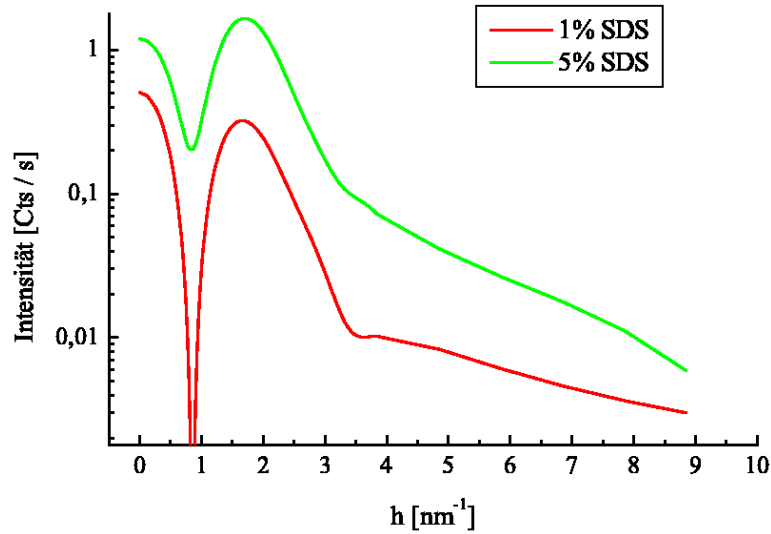


Abbildung 4.13: Entschmierte, d.h. durch Spaltlängen- und -weitenprofil korrigierte Streukurven.

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(hr)}{hr} dr$$

Durch eine Fourier-Transformation ließe sich aus der Streukurve die Elektronenabstandsfunktion direkt errechnen. Die experimentell gewonnene Streukurve wird jedoch nur auf einem beschränkten Bereich von  $h$  aufgenommen. Die daraus resultierenden Abbruchkanten führen bei einer direkten Fourier-Transformation zu starken artifiziellen Oszillationen in der Elektronenabstandsfunktion, die eine weitere Interpretation von  $p(r)$  unmöglich machen [155].

Das Problem der Abbrucheffekte löst die von Otto Glatter entwickelte Methode der *Indirekten Fourier-Transformation* [153, 155, 156]. Auf dieser Methode basiert das Auswerteprogramm *ITP-92*. Auswertungen der SAXS-Streukurven nach anderen existierenden Methoden von Moore [157], Svergun et al. [158] sowie Hansen und Skov-Pedersen [159] unterscheiden sich im Ergebnis nicht wesentlich von der hier praktizierten Methode nach Glatter [159]. Die Berechnung der Elektronenabstandsfunktion erfolgte deshalb mit dem von O. Glatter entwickelten Programm *ITP-92*, dessen Theorie im nächsten Abschnitt erläutert ist.

### 4.2.5 Auswertung der Streukurven mit ITP-92

Die *Indirekte Fourier-Transformation* geht davon aus, dass nicht die gemessene Streukurve als Ausgangsfunktion dient, sondern eine aus Modellvorgaben erstellte angenommene Elektronenabstandsfunktion  $p_A(r)$  des gemessenen Objekts. Dabei nutzt man aus, dass das Streuobjekt eine endliche Ausdehnung hat, die Elektronenabstandsfunktion also nur auf einem beschränkten Bereich von Null verschieden ist. Ist die maximale Ausdehnung bekannt, tritt demzufolge kein Abbrucheffect auf. Eine Fourier-Transformation dieser Funktion liefert somit die entschmierte Streukurve ohne künstliche Oszillationen, die anschließend mit Hilfe der Strahllängen- und -weitenprofile künstlich verschmiert wird. Der Vergleich der somit enthaltenen theoretischen Streukurve  $I_{th}(h)$  mit der experimentellen Streukurve  $I_{exp}(h)$  liefert eine Abweichung. Mittels eines iterativen Algorithmus wird diese Abweichung minimiert. Abb. 4.14 zeigt den Verlauf der Auswertung. Da das Wellenlängenspektrum nicht bekannt war, wird im Rahmen dieser Arbeit von einer monochromatischen Cu-K $\alpha$ -Strahlung ausgegangen und auf die mit  $T_2$  bezeichnete Wellenlängen-Entschmierung verzichtet.

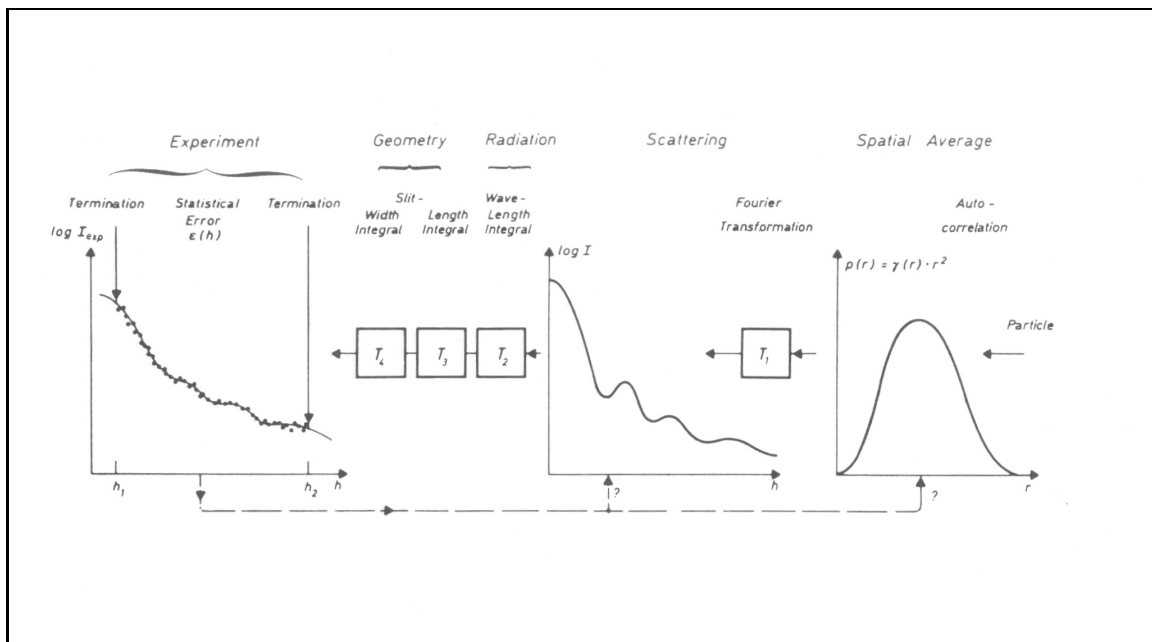


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der indirekten Fourier-Transformation nach der Methode von O. Glatter [153].

Zur Auswertung der Streukurven nach obigem Schema muss eine  $p(r)$ -Funktion aus Modellvorgaben angenommen werden. Die Modellvorgaben sind die maximale Ausdehnung und die Symmetrie der zu messenden Partikel. Zur Symmetrie können drei Möglichkeiten gewählt werden [139, 154, 160]:

## 1. Kugelsymmetrie.

Bei angenommener Kugelsymmetrie werden die Elektronenabstände über alle 3 Raumrichtungen gemittelt.

## 2. Zylindersymmetrie.

Ausgehend von einem zylinderförmigen Streuobjekt setzt sich die gemessene Streukurve aus der Streukurve eines unendlich langen und dünnen Zylinders und der Streukurve des Zylinderquerschnitts zusammen [139]. Die  $p(r)$ -Funktion des Zylinderquerschnitts ist die Lösung, die alle relevanten Informationen enthält.

## 3. Blättchensymmetrie.

Die Streukurve des blättchenförmigen Partikels setzt sich aus der Streukurve eines unendlich flachen und ausgedehnten Plättchens und der Streukurve seines Dickenprofils zusammen. Bei Annahme blättchenförmiger Teilchen erhält man als Lösung die  $p(r)$ -Funktion des Dickenprofils des Partikels.

Für das Beispiel der SDS-Mizellen wurde Kugelsymmetrie postuliert. Die maximale Ausdehnung beträgt lt. Literatur ca.  $D_{max} = 6$  nm. Aus auswertungstechnischen Gründen ist es nötig, den Wert zur Begrenzung der  $p(r)$ -Funktion etwas höher anzusetzen [161]. Für dieses Beispiel wurde  $D_{max} = 9$  nm angenommen. Als Modellfunktion wird eine Linearkombination ideal glatter Teilfunktionen, sog. *kubischer B-Splines*  $\phi_j$  angenommen [156].

$$p_A(r) = \sum_{j=1}^N c_j \phi_j(r) \quad ; \quad p(r) = 0 \quad \text{für} \quad r > D_{max} \quad (4.7)$$

Aufgrund der Linearität aller verwendeter Transformationen  $T_i$  können die Splines einzeln transformiert werden. Es sei:

$$\chi_j(h) = T_4 T_3 T_1 \phi_j(r) \quad (4.8)$$

wobei  $T_1$  die Fourier-Transformation von Ortsraum in den reziproken Raum,  $T_3$  und  $T_4$  Strahllängen- und -weitenentschmierung darstellen. Daraus ergibt sich eine theoretische, verschmierte Streukurve:

$$I_{th}(h) = \sum_{j=1}^N c_j \chi_j(h) \quad (4.9)$$

Die theoretische Streukurve wird nun mit der experimentellen Streukurve verglichen. Die Modellfunktion  $p_A(r)$  wird so lange variiert, bis die mit dem *Weighted Least Squares*-Algorithmus berechnete Abweichung  $L$  minimal ist:

$$L = \int_{h_{min}}^{h_{max}} \frac{\left[ I_{exp}(h) - \sum_{j=1}^N c_j \chi_j(h) \right]^2}{\sigma^2(h)} dh = \min \quad (4.10)$$

Da wegen der niedrigen Strahlungsintensität nur Einfach-Messungen mit langer Messdauer durchgeführt werden, können keine Fehlergrenzen angegeben werden. Die Varianzen  $\sigma^2(h)$  werden daher für alle Streuvektoren  $h$  gleich 1 gesetzt.

Ist das Minimierungsproblem gelöst, ergibt sich aus den Koeffizienten  $c_j$  die Lösungsfunktion nach Gleichung (4.7). Diese Funktion ist jedoch in der Regel instabil, d.h. es treten starke Oszillationen in  $p(r)$  auf, die nach ausgeführter Transformation im relevanten Messbereich der Streukurve nicht wiederzufinden sind. Weil die Oszillationen nicht die wahre Elektronenverteilung des Partikels widerspiegeln, machen sie eine Interpretation der Elektronenabstandsfunktion unmöglich.

O. Glatter [155, 156] löste dieses Problem durch die Forderung, dass die Unterschiede benachbarter Koeffizienten möglichst gering sein sollen. Als Nebenbedingung eines Lagrange-Problems wird die Norm der ersten Ableitung des Koeffizientenvektors  $\mathbf{c}$  minimiert, da die Koeffizienten einer instabilen Lösungsfunktion extreme Werte annehmen.

$$N_{c'} = \sum_{j=1}^{N-1} (c_{j+1} - c_j)^2 = \min \quad (4.11)$$

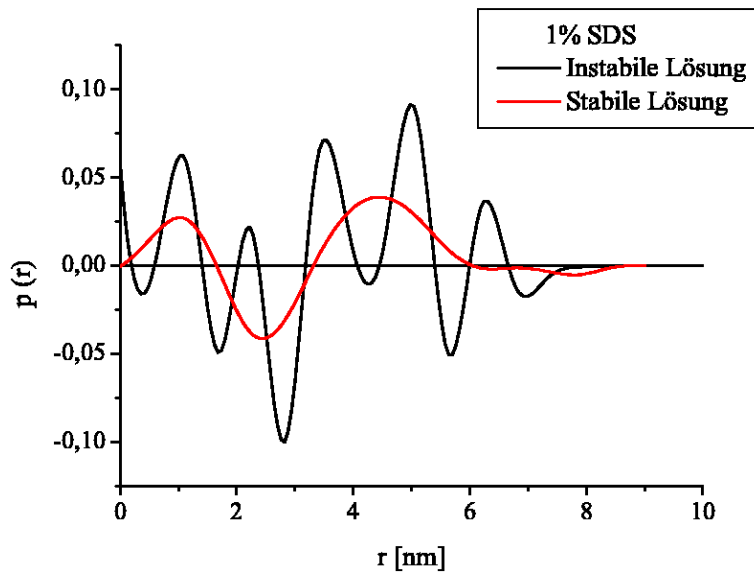


Abbildung 4.15: Unstabilisierte und stabilisierte Lösung der indirekten Fourier-Transformation.

Das Lagrange-Problem zeigt sich damit durch folgende Gleichung:

$$L + \lambda N_{c'} = \min \quad (4.12)$$

Mit dem Lagrange-Parameter  $\lambda$  wird angegeben, ob bei der Lösung mehr Gewicht auf eine geringe Abweichung ( $\lambda$  klein) oder auf die Stabilität ( $\lambda$  groß) gelegt wird.

Mit der von Glatter beschriebenen Sattelpunktmethode [156] kann der optimale Lagrange-Parameter  $\lambda_{opt}$  ermittelt werden. Die Lösung des Lagrange-Problems (4.12) liefert die Lösungskoeffizienten  $c_j$  für die  $p(r)$ -Funktion. Das Problem der Stabilisierung verdeutlicht Abb. 4.15. Dargestellt sind zwei Lösungsfunktionen  $p(r)$  für 1% SDS-Mizellen. Die rote Kurve stellt eine optimal stabilisierte Lösung dar, während die schwarze Kurve nur mit dem Minimierungsproblem (4.10) ohne weitere Stabilisierung bestimmt wurde. Ein zu groß gewähltes  $\lambda$  dagegen hätte eine Überstabilisierung und damit den Verlust vieler relevanter Strukturen der  $p(r)$ -Funktion zur Folge.

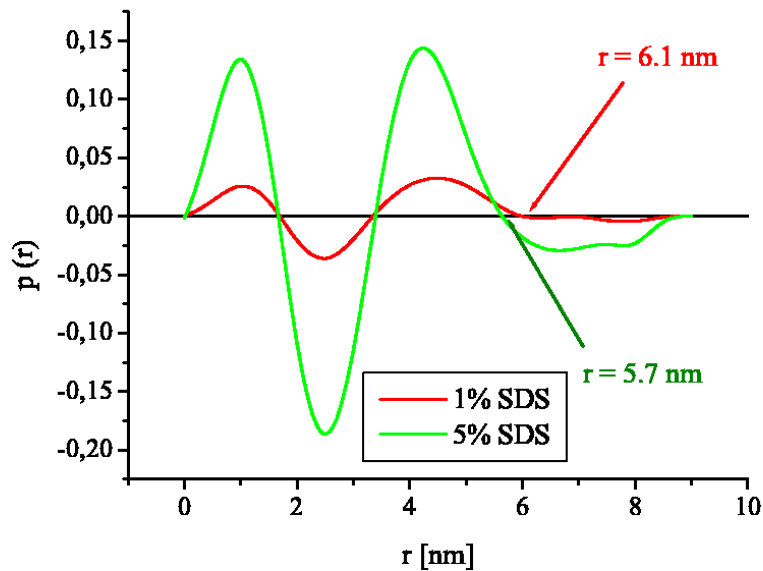


Abbildung 4.16: Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  für SDS-Mizellen unter Annahme von Kugelsymmetrie.

#### 4.2.6 Die Elektronenabstandsfunktion $p(r)$

Für das Beispiel der SDS-Mizellen hat die Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  folgendes Aussehen (Abb. 4.16):

Die Elektronenabstandsfunktionen  $p(r)$  geben die Häufigkeit an, innerhalb des Partikels Elektronenpaare im Abstand  $r$  zu finden. Sie können folgendermaßen interpretiert werden [162]:

- Die Symmetrie der Elektronenabstandsfunktionen suggeriert, daß die Annahme einer Kugelsymmetrie zutreffend war. Asymmetrische Partikel hätten eine ebenfalls asymmetrische  $p(r)$ -Funktion zur Folge
- Die Schwankungen der  $p(r)$ -Funktion ins Negative deuten auf Bereiche mit negativer Elektronendichte bezogen auf das Lösungsmittel hin, was auf den mizellaren Kern zutrifft.
- Der letzte Schnittpunkt mit der Abszisse gibt die maximale Ausdehnung der Partikel an. Diese stimmt mit den Literaturwerten sehr gut überein (Tab. 4.1).
- Die höher konzentrierte mizellare Lösung weist etwas kleinere Assoziate auf ( $r=5.7$  nm) Außerdem ist  $p(r)$  für größere Werte von  $r$  nicht identisch Null. Beide Effekte können sowohl aus Messungenauigkeiten resultieren als auch Folge interpartikulärer Wechselwirkungen aufgrund einer evtl. zu hohen Konzentration an SDS-Mizellen sein [161].
- Die erhaltenen Kurven entsprechen in Form und Ausdehnung den Literaturangaben [143–145]. Die wesentlich ausführlicheren Untersuchungen von Itri und Amaral berücksichtigen für die höher konzentrierten Systeme noch die interpartikuläre Interferenz und berechnen eine leichte Anisometrie aus den  $p(r)$ -Funktionen. Den Zweck der Validierung der Messungen mit der Kratky-Kamera erfüllen jedoch bereits die hier präsentierten Auswertungen.

Tabelle 4.1: Vergleich der Literaturdaten für die Größe der SDS-Mizellen mit den Daten dieser Arbeit.

| Studie                     | $c(\text{SDS})[\%]$ | $d$ [nm]           |
|----------------------------|---------------------|--------------------|
| Kratky & Müller 1982 [143] | 1-10                | 6.4*               |
| Itri & Amaral 1991 [144]   | 5                   | $5.9 \pm 0.1$      |
|                            | 9                   | $6.2 \pm 0.1$      |
|                            | 15                  | $5.4 \pm 0.1^{**}$ |
| Messungen in dieser Arbeit | 1                   | $6.1 \pm 0.2^*$    |
|                            | 5                   | $5.7 \pm 0.2^{**}$ |

\* bei 37°C in 0.15 mol NaCl

\*\* Starke Interferenzeffekte sorgen für negative Oszillationen [144]

#### 4.2.7 Bestimmung des Elektronendichteprofiles

Die Bestimmung der radialen Elektronendichteverteilung  $\rho(r)$  aus der Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  erfolgt nach einem iterativen Verfahren, das dem oben beschriebenen

zur Ermittlung von  $p(r)$  ähnelt.

Die Elektronendichte ist mit der Elektronenabstandsfunktion mathematisch über eine Faltung verknüpft. Für Kugelsymmetrie gilt:

$$p(r) = r^2 \int_{-\infty}^{\infty} \rho(x) \rho(x-r) dx \quad (4.13)$$

Es wird eine Elektronendichtefunktion  $\rho_A(r)$  postuliert. Diese setzt sich aus Stufenfunktionen  $\psi_j(r)$  zusammen, die nur auf einem beschränkten Intervall definiert sind (Gl. 4.14) [163, 164]:

$$\rho_A(r) = \sum_{j=1}^N c_j \psi_j(r) \quad \text{mit} \quad \psi_j(r) = \begin{cases} 1 & : r \in [R_{j-1}, R_j] \\ 0 & : \text{sonst} \end{cases} \quad (4.14)$$

Die Koeffizienten  $c_j$  werden analog zur Bestimmung von  $p(r)$  mit einem iterativen Verfahren ermittelt. Nach Faltung der postulierten Funktion  $\rho_A(r)$  nach Gl. (4.13) wird die so erhaltene  $p(r)$ -Funktion mit der experimentell bestimmten verglichen und die Differenz minimiert. Unter Berücksichtigung einer Stabilitätsbedingung können die  $c_j$  mit einem Lagrange-Verfahren ermittelt werden. Das Verfahren ist ausführlich in [163, 164] beschrieben.

Die Bestimmung des Elektronendichteprofiles ist nur für nahezu symmetrische Streuobjekte sinnvoll [163]. Zur Berechnung von  $\rho(r)$  wurde das Programm DEC-92 von O. Glatter verwendet. Für die SDS-Mizellen ergibt sich das radiale Elektronendichteprofil nach Abb. 4.17. Die im inneren Teil der Mizelle lokalisierten Kohlenwasserstoffreste der SDS-Moleküle sind an der im Vergleich zum Lösungsmittel negativen Elektronendichte deutlich zu erkennen. Der hydrophile Außenteil zeigt eine nur leicht höhere Elektronendichte als die Umgebung.

Die Ausdehnung der Mizellen von etwa 6 nm konnte in Grenzen bestätigt werden. Die Berechnung von  $\rho(r)$  ist ungenauer als die Bestimmung von  $p(r)$ , da sich die Ungenauigkeiten der beiden iterativen Verfahren addieren. Als Fehlerquellen sind im Beispielfall besonders die Wahl der Definitionsbereiche der Stufenfunktionen, die leichte Anisotropie der Mizellen und der geringe Elektronendichteunterschied zwischen dem hydrophilen Teil der Mizelle und dem Lösungsmittel zu betrachten. Beispiele für die Genauigkeit der Methode sind im Manual zum Programm DEC-92 enthalten [165]. Wegen der Ungenauigkeiten sind mit  $\rho(r)$  nur qualitative Aussagen über die Struktur des Streuobjekts zu machen bzw. Modellannahmen zu bestätigen.

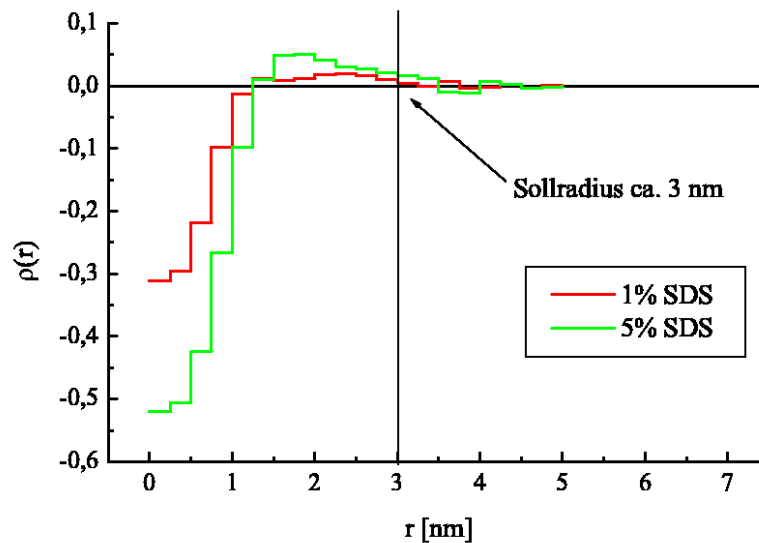


Abbildung 4.17: Radiale Elektronendichtefunktion  $\rho(r)$  von SDS-Mizellen.

### 4.3 Messung zylindrischer Streuobjekte

Als Beispiel für zylindrische Partikel wurde eine verdünnte invers mizellare Lösung, bestehend aus 2% Lecithin in Isopropylmyristat verwendet. Abhängig vom Wasseranteil im System findet ein Wachstum der Aggregate zu langen, stäbchenförmigen Mizellen, den Spaghettimizellen statt (s. Kap. 2). Dieser Abschnitt soll nur einen kurzen Abriss über die Interpretation der  $p(r)$ -Funktion zylindrischer Streuobjekte geben. Ausführliche Untersuchungen dieser invers mizellaren Systeme sind in Kap. 5 zu finden. Das System aus diesem Beispiel hatte einen Wasseranteil von  $c_{aq} = 1.0\%$  bzgl. einer unverdünnten, 30%igen Standard-IML (s. Kap. 3.2). Abb. 4.18 zeigt die Elektronenabstandsfunktion bei angenommener Kugelsymmetrie.

An der ausgeprägten Asymmetrie des Kurvenverlaufs ist zu erkennen, daß es sich hierbei um stark anisometrische Partikel handelt. Ein Vergleich mit Literaturdaten lässt auf Zylinder schließen [162]. Die Kurve kann folgendermaßen interpretiert werden:

- Die Elektronenabstandsfunktion stellt nur Bereiche innerhalb der Probe dar, die sich in der Elektronendichte von der Umgebung unterscheiden. Im Falle der inversen Mizellen ist dies ausschließlich der hydrophile Kern des Lecithins. Die lipophilen Molekülreste unterscheiden sich in der Elektronendichte nicht vom lipophilen Lösungsmittel. Es kann also nur der mizellare Kern interpretiert werden.
- Der häufigste Elektronenabstand (grüner Pfeil) ist ein Maß für die kleinste, der Nulldurchgang (roter Pfeil) für die größte Dimension des Streuobjekts. Die Ani-



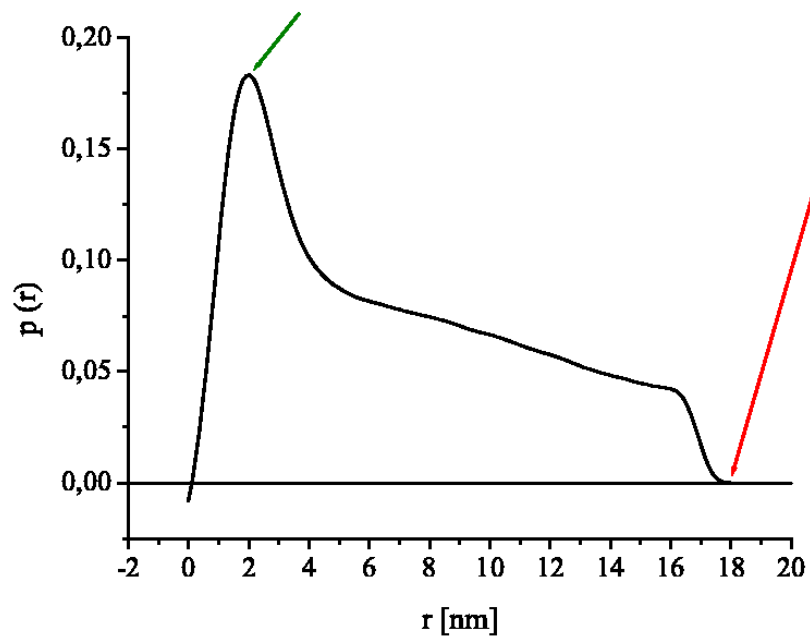


Abbildung 4.18: Elektronenabstandsfunktion inverser Mizellen aus Lecithin in IPM.

sometrie des Objektes ist aufgrund des asymmetrischen Kurvenverlaufs deutlich erkennbar.

- Der Nulldurchgang wurde durch die Angabe einer Maximalgröße des Partikels von  $D_{max} = 18$  nm künstlich verursacht. Die Partikel scheinen größer als 18 nm zu sein, da zylindrische Partikel einen linearen Auslauf zu hohen Streuvektoren zeigen [162]. Weil mit der Kamera in dieser Einstellung maximal 18 nm auflösen sind, ist die Angabe noch größerer Dimensionen nicht sinnvoll; die Streukurve würde in diesem Fall zu sehr kleinen Winkeln extrapoliert werden, was einen nicht kalkulierbaren Fehler zur Folge hätte.
- Der Wendepunkt der  $p(r)$ -Funktion hinter dem Maximum gibt die Ausdehnung des Zylinderquerschnitts an [166].

Setzt man für das Streuobjekt Zylindersymmetrie voraus, so erhält man als Resultat der indirekten Fourier-Transformation die  $p(r)$ -Funktion des Zylinderquerschnitts, die für das obige invers mizellare System in Abb. 4.19 abgebildet ist. Aus dem Nulldurchgang der Kurve (roter Pfeil) lässt sich die maximale Ausdehnung, aus dem Kurvenmaximum (grüner Pfeil) die kleine Halbachse ablesen. Die Symmetrie der Kurve deutet auf eine nur geringe Anisometrie, also auf einen fast kreisförmigen Querschnitt hin.

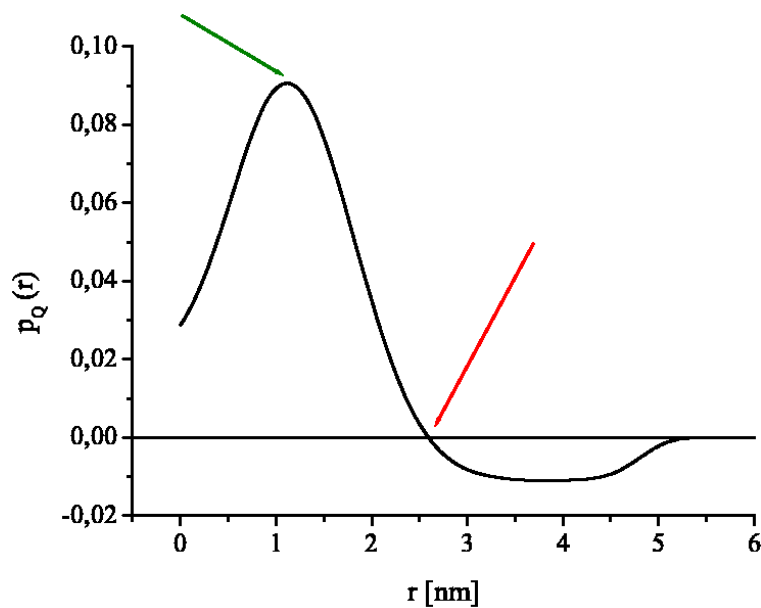


Abbildung 4.19: Elektronenabstandsfunktion des Zylinderquerschnitts der inversen Mizellen.

Am von Null verschiedenen Ordinatenabschnitt und an der Schwingung der  $p(r)$ -Funktion ins Negative ist eine Abweichung von der Modellvorstellung unendlich langer und dünner Zylinder zu erkennen. Da die inversen Mizellen eine endliche Ausdehnung haben, sind solche Effekte zu erwarten [167]. Das Ausmaß dieser Abweichungen nimmt mit zunehmender Längsausdehnung der Zylinder ab. Dieser Effekt konnte bei Wasserzusatz zu den Systemen beobachtet werden (s. Kap. 5). Die Abweichungen lassen sich nicht auf interpartikuläre Wechselwirkungen aufgrund einer zu hohen Konzentration zurückführen, da bei stark anisotropen Partikeln unterhalb einer Konzentration von 10% Konzentrationseffekte vernachlässigbar sind [139]. Messungen bei geringeren Konzentrationen als 2% zeigten auch keine signifikanten Differenzen in der Streukurve (Abb. 4.20).

## 4.4 Der Streumassenradius nach Guinier

Die indirekte Fourier-Transformation zur Analyse der Form und Struktur des Partikels ist u.U. sehr aufwändig. Eine Bestimmung von Informationen über das Streuobjekt ist prinzipiell direkt aus der Streukurve mit der Methode von Guinier möglich [136, 138]. Diese Methode ist dann sinnvoll anwendbar, wenn die Symmetrie der Streuobjekte bekannt ist und die Streuobjekte eine homogene Elektronendichte aufweisen [143, 166]. Die Guinier-Auswertung erfolgt theoretisch an den entschmierten Streukurven. Da die Entschmierung gleichzeitig mit der indirekten Fourier-Transformation bei der Ausführung

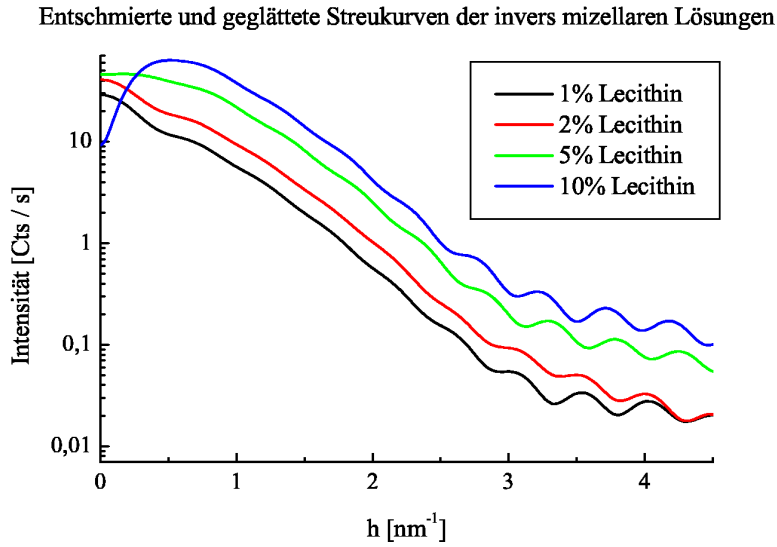


Abbildung 4.20: Entschmierte Streukurven invers mizellarer Lösungen Lecithin in IPM mit unterschiedlichen Lecithin-Anteilen. Erst bei Lecithin-Konzentrationen von  $\Phi > 2\%$  ist ein Einfluss auf die Streukurve zu beobachten.

des Programms ITP-92 erfolgt, bedeutet eine quantitative Guinier-Auswertung keinerlei Zeitvorteil. Die entschmierten Streukurven weisen nebenbei zu wenig Messpunkte für eine hinreichend genaue Auswertung auf. Als Konsequenz aus diesen Überlegungen wurde die Guinier-Auswertung an den verschmierten Streukurven durchgeführt und im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten [31, 168] nur zur qualitativen Interpretation herangezogen.

Mit der Guinier-Auswertung wird der Streumassenradius  $R_g$  berechnet. Als mittleres Abstandsquadrat der Elektronen vom Streuzentrum des Partikels ist er analog zum Trägheitsmoment der Mechanik zu verstehen, welches das mittlere Abstandsquadrat der Massepunkte vom Schwerpunkt angibt.

Bei angenommener Kugelsymmetrie gilt im Bereich sehr kleiner Winkel der Streukurve  $I(h)$ :

$$I(h) = I_0 \exp\left(\frac{-h^2 R_g^2}{3}\right) \quad (4.15)$$

Wird der natürliche Logarithmus von  $I(h)$  gegen  $h^2$  aufgetragen, kann aus der Geradensteigung  $m$  aus dem Innenteil der Streukurve der Streumassenradius  $R_g$  berechnet werden (Abb. 4.21).

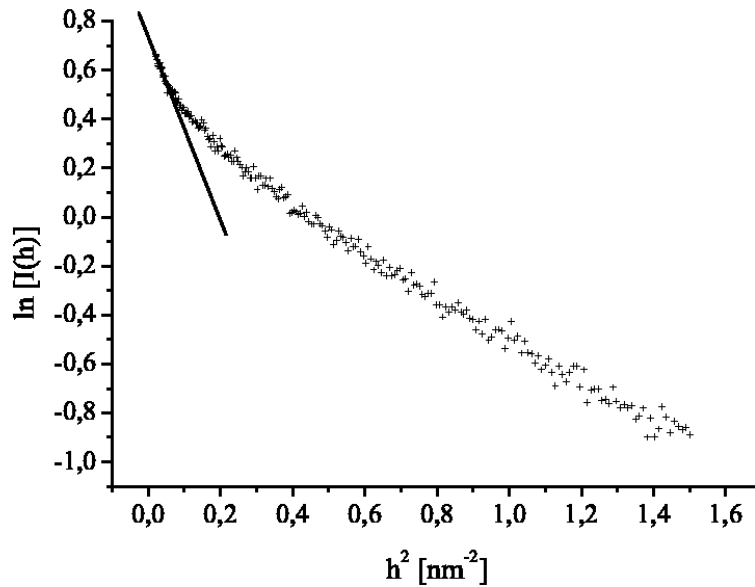


Abbildung 4.21: Darstellung nach Guinier  $\ln(I(h))$  gegen  $h^2$  zur qualitativen Bestimmung des Streumassenradius des Streuobjekts aus der verschmierten Streukurve. Beispiel aus Abb. 4.18.

$$R_g = \sqrt{-3m} \quad (4.16)$$

Aus dem Streumassenradius können Informationen über die Ausmaße des Streuobjekts erhalten werden. Mittelbach [169] fasste für ausgewählte Geometrien homogener Körper die Beziehungen zwischen geometrischen Abmessungen und Streumassenradius zusammen. Betrachtet man Beispiele aus diesem Kapitel, so ist zu erkennen, dass eine Auswertung mit der Guinier-Methode rasch an ihre Grenzen stößt. Bei den SDS-Mizellen liegen zwei Bereiche unterschiedlicher Elektronendichte vor. Die Modelle homogener Körper sind demzufolge nicht auf diese Systeme anwendbar. Zur Größenbestimmung der Mizellen fehlen mehrere Informationen, nämlich die Ausdehnung des lipophilen Bereichs im Vergleich zur gesamten Mizelle und die Elektronendichtedifferenz  $\Delta\rho$  zwischen Innen- und Außenteil. Falls die Streuobjekte keine Kugelsymmetrie aufweisen, ist die Kenntnis der Verhältnisse der verschiedenen Abmessungen wie der Halbachsen oder der Zylinderhöhe nötig. Für die im obigen Beispiel vermessenen Zylinder kommt erschwerend hinzu, dass die Gesamtausdehnung so groß ist, dass der lineare Bereich im inneren Teil der Streukurve so nah am Primärstrahl ist, dass er nicht mehr dargestellt werden kann. Der innere Bereich (Abb. 4.21) ist damit nicht mehr linear, sondern die Steigung nimmt zu kleinen  $h$  zu.

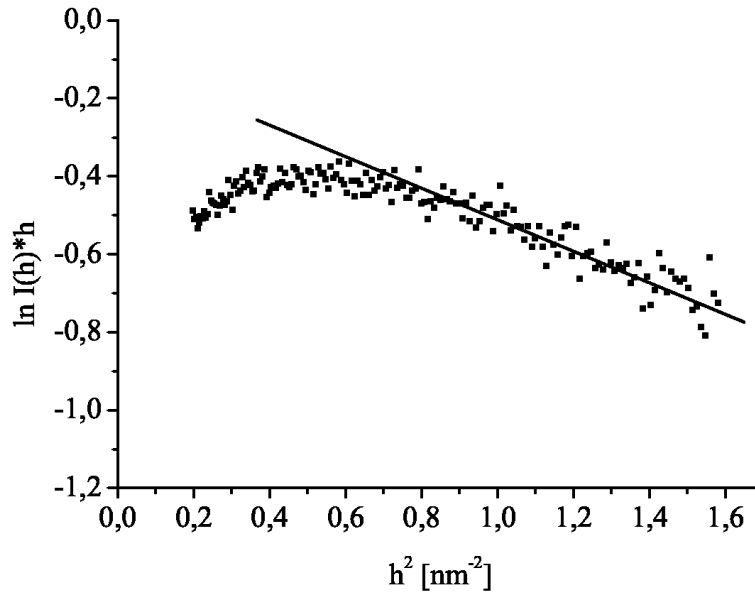


Abbildung 4.22: Darstellung nach Guinier  $\ln(I(h)) \cdot h$  gegen  $h^2$  zur Bestimmung des Streumassenradius des Zylinderquerschnitts aus der verschmierten Streukurve. System aus Beispiel.

Für zylindrische Objekte ist es jedoch möglich, den Streumassenradius  $R_q$  des Zylinderquerschnitts anzugeben. Dieser lässt sich aus der Steigung der Guinier-Darstellung des Querschnitts  $\ln I(h) \cdot h$  gegen  $h^2$  berechnen [153] (Abb. 4.22).

$$R_q = \sqrt{-2m} \quad (4.17)$$

Zu erkennen ist, dass der lineare Bereich hier nicht zu kleinen Winkeln, sondern eher im Mittelteil der Streukurve zu finden ist. Die Ursache dieses Phänomens ist in der Modellannahme unendlich langer Zylinder zu suchen. Da es sich bei den Streuobjekten in diesem Fall um endliche Zylinder handelt, fehlen die sehr großen Entfernungen. Diese streuen nach dem Reziprozitätsgesetz aber zu sehr kleinen Winkeln – daher der Intensitätseinbruch. Je kürzer die Zylinder sind, desto stärker tritt dieser Effekt auf [139].

Die Berechnung des Querschnittsradius erfolgt – falls der Zylinder homogen ist – nach:

$$r_{\text{zyl}} = \sqrt{2} \cdot R_q \quad (4.18)$$

## 4.5 Messung lamellarer Systeme

Liegen ausgedehnte, flache Partikel vor, so kann unter Annahme von Blättchensymmetrie das Dickenprofil dieser Partikel bestimmt werden. Unter dieser Annahme lässt sich die Streukurve zusammengesetzt aus der Streuung einer stark verdünnten Lösung von unendlich großen und unendlich dünnen Blättchen und der Streuung des Dickenprofils interpretieren [139]. Da erstere einfach analytisch berechnet werden kann, wird das Dickenprofil analog zum Zylinderquerschnitt über ITP-92 errechnet. Schütze nutzte dieses Prinzip zur Messung der Multilayerprofile von Liposomen [170]. Eine solche Messung ist möglich, da die Ausdehnung des gesamten Liposoms sehr groß gegenüber der Bilayerdicke ist, die Krümmung demzufolge vernachlässigt werden kann [171].

Zur Demonstration dieses Verfahrens wurden Liposomen vermessen, die aus 3% Lecithin in Wasser bestehen. Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch Ultraschall [172]. Die Streukurve wies einen starken Anstieg zu kleinen Winkeln und ein breites Maximum bei  $h \approx 1.0 \text{ nm}^{-1}$  auf, was typisch für Streukurven von Liposomen ist [173]. Das breite und diffuse Maximum deutet auf eine geringe Anzahl an Bilayern hin; in diesem Fall kann sogar von unilamellaren Systemen ausgegangen werden [171].

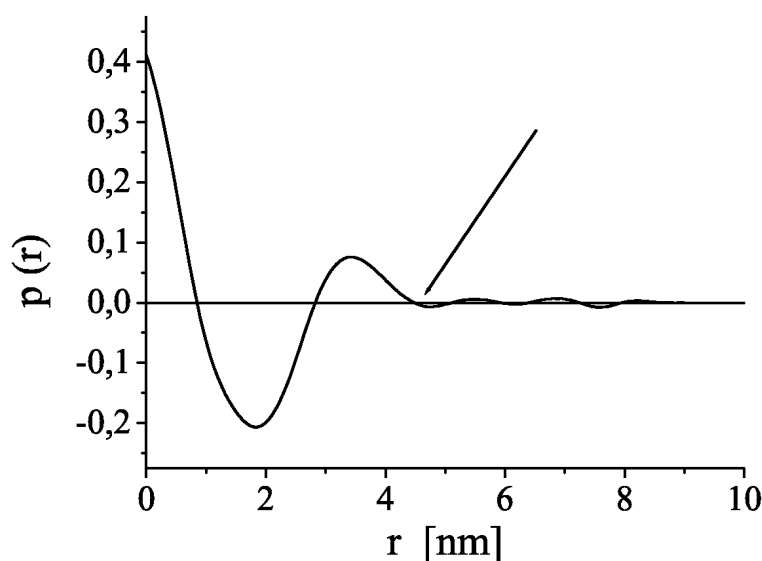


Abbildung 4.23: Dickenprofil des Bilayers unilamellarer Liposomen, berechnet mit ITP-92.

Die Elektronenabstandsfunktion des Dickenprofils ist in Abb. 4.23 zu sehen. Die Bilayerdicke ist durch den dritten Nulldurchgang der  $p(r)$ -Funktion gegeben [174, 175] und liegt bei  $d = 4.5 \pm 0.2 \text{ nm}$ , was mit Literaturwerten für unilamellare Liposomen aus Phos-

phatidylcholin übereinstimmt [175]. Vollständig hydratisiertes Lecithin bildet Bilayer mit einer Dicke von  $d \approx 6.1$  nm einschließlich Hydratschicht [18, 176]. Da das Hydratwasser sich in der Elektronendichte nicht vom Lösungsmittel unterscheidet, kann es mit SAXS nicht detektiert werden. Die gemessene Bilayerdicke bezieht sich also auf die reinen Phospholipide, was den geringeren Wert erklärt. Eine Berechnung der Bilayerdicke über die Guinier-Auswertung ist entgegen der Angaben von Schütze [168] nicht sinnvoll, da hier wiederum die nicht bekannten Elektronendichteunterschiede der hydrophilen und lipophilen Bereiche des Bilayers berücksichtigt werden müssten [173].

## 4.6 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Systemen, die eine lamellare Struktur aufweisen, handelt es sich nicht um Liposomen, sondern um weit ausgedehnte lamellare flüssig-kristalline Bereiche, die sowohl in weit ausgedehnten Domänen vorliegen können als auch vesikuläre Defektstrukturen aufweisen können [18, 103]. Bei diesen Systemen ist es nicht mehr möglich, eine maximale Ausdehnung anzugeben; man geht in diesem Fall von unendlich ausgedehnten Bereichen aus. Eine maximale Dimension  $D_{max}$  ist aber aus den oben beschriebenen Gründen für die Auswertung mit ITP-92 essenziell.

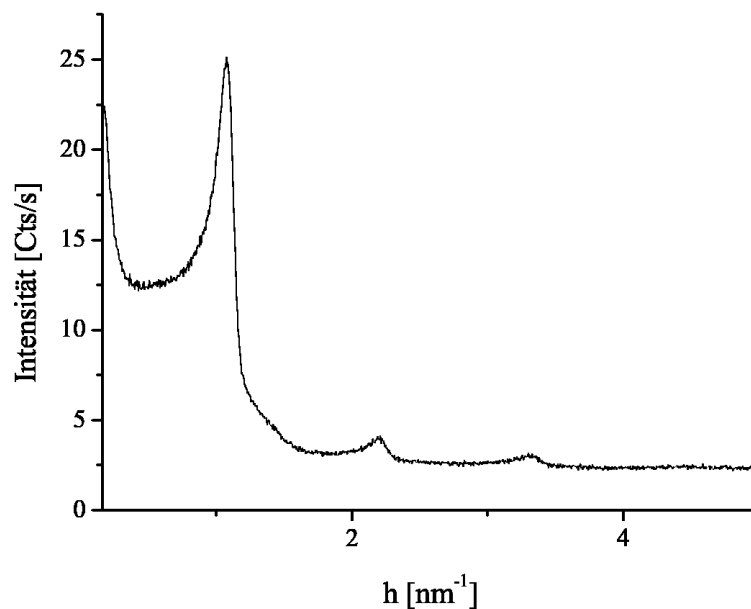


Abbildung 4.24: Beugungskurve eines ternären lamellaren Systems Lecithin:IPM 30:70 mit 13.3 % Wasser.

Da weit ausgedehnte lamellare Bereiche eine periodische Elektronendichte aufweisen,

zeigen die Streukurven solcher Systeme scharfe Maxima (Abb. 4.24). Streukurven mit scharfen Interferenzen werden auch *Beugungskurven*, das Messverfahren Röntgenkleinwinkelbeugung oder *Small Angle X-ray Diffraction (SAXD)* genannt. Die Position  $\vartheta$  bzw.  $h$  der Maxima ist über die Bragg'sche Beziehung

$$n\lambda = 2d \sin \vartheta \quad \Leftrightarrow \quad d = \frac{2n\pi}{h} \quad (4.19)$$

mit den Netzebenenabständen  $d$  der lamellaren Systeme verknüpft. Die Position der Maxima ist jedoch in der verschmierten Streukurve von der wirklichen Position in der entschmierten Kurve leicht verschieden. Es gibt nun zwei Möglichkeiten, dieses Problem zu lösen.

1. Die Systeme werden in einer Kiessig-Kamera mit Lochblenden-System gemessen. Die mit dieser Kamera erzeugten Beugungskurven müssen nicht entschmiert werden, weisen jedoch wesentlich schwächere Intensitäten und eine starke parasitäre Streuung zu sehr kleinen Winkeln auf. Außerdem sind die Proben nicht temperierbar und die Probenhalter für sehr flüssige Systeme häufig undicht, was für weitere Fehlerquellen sorgt. Lochblendenkameras werden häufig dort eingesetzt, wo starke Röntgenquellen vorliegen, wie z.B. an Speicherringen. Weiter perfektionierte Systeme erzeugen unverschmierte Streubilder mit sehr hohe Schärfe [177].
2. Die verschmierten Beugungskurven der Kratky-Kamera werden entschmiert. Da ITP-92 nur Streukurven von Partikeln mit einer maximalen Ausdehnung  $D_{max}$  bearbeiten kann, wird das von O. Glatter und K. Gruber entwickelte Entschmierungsprogramm ITR verwendet [178]. Dieses Programm hat als Grundlage eine Spline-Anpassung an die Streukurve im reziproken Raum.

$$I_A(h) = \sum_{j=1}^N c_j \phi_j(h) \quad (4.20)$$

Die Transformation der Splines  $\phi_j(h)$  findet – mit der Einschränkung, dass keine Fourier-Transformation  $T_1$  erfolgt – wie in Gl. (4.8) beschrieben statt.

$$\psi_j(h) = T_4 T_3 \phi_j(h)$$

Für diese Transformation ist die Angabe einer maximalen Ausdehnung nicht erforderlich, weil bei den der Entschmierung des Strahlprofils dienenden Transformationen  $T_4$  und  $T_3$  keine Abbrucheffekte auftreten. Der weitere Verlauf dieser Methode ist dem der indirekten Fourier-Transformation gleich. Da im wesentlichen die Beugungsmaxima von Interesse sind, wurde eine Peak-Erkennungs-Routine vorschaltet. In der Umgebung eines Maximums wird dann eine deutlich höhere Anzahl



an Splines verwendet. Diese Methode hat als einzigen Nachteil die teilweise sehr aufwändige Peakerkennung sowie Stabilisierung der Lösungsfunktion.

Beide Methoden wurden in dieser Arbeit eingesetzt, wobei sich die zweite Methode mit der Kratky-Kamera als die wesentlich genauere herausstellte. Dabei konnten teilweise Maxima noch aufgelöst werden, die in der verschmierten Kurve kaum vom Rauschen zu unterscheiden sind. In der Auswertung wurden jedoch keine Maxima interpretiert, die in der verschmierten Original-Streukurve nicht wenigstens ansatzweise erkennbar sind.

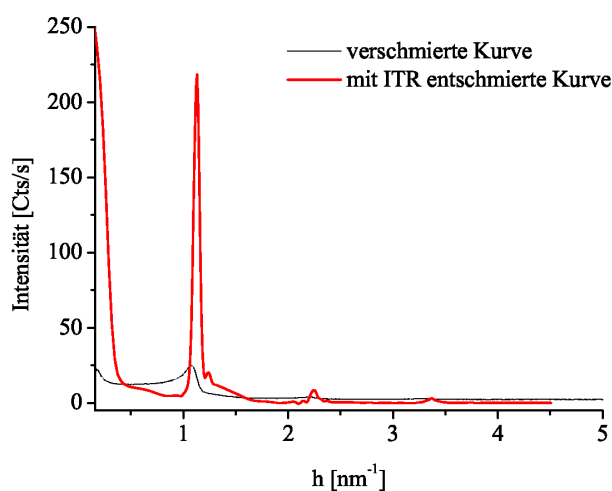


Abbildung 4.25: Verschmierte Original-Streukurve aus Abb. 4.24 im Vergleich zur gleichen, mit ITR entschmierten Streukurve.

Abb. 4.25 zeigt einen Vergleich zwischen entschmierter und verschmierter SAXD-Streukurve.

# Kapitel 5

## Experimentelle Resultate

Das Ziel dieser Arbeit ist, Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Wasser und solubilisierten Arzneistoffen mit den als Arzneistoffträger dienenden inversen Mizellen zu erhalten. Die hierfür eingesetzten und in *Kapitel 3* beschriebenen Methoden lassen sich in zwei Kategorien unterteilen:

- Methoden, mit denen die Assoziate als Ganzes charakterisiert werden. Zu ihnen zählen die bildgebenden Verfahren wie Polarisations- und Elektronenmikroskopie, die Photonenkorrelationsspektroskopie zur Bestimmung der Mizellgröße sowie die strukturaufklärenden Methoden Röntgenkleinwinkelstreuung und -beugung.
- Methoden, mit denen die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden und solubilisierten Molekülen bestimmt werden können. Dieses sind die spektroskopischen Messungen NMR und FTIR.

### 5.1 Durchführung der Messreihen

Für die Durchführung der Messreihen wurde jeweils derselbe Messplan zugrunde gelegt:

Die Herstellung der IML-Stammlösungen fand wie in *Kap. 3.2* beschrieben statt. Der Verlauf einer Messreihe bestand daraus, das Wasser durch Evaporisation auf einem beheizten Magnetrührer unter Rühren langsam aus der Probe zu entfernen. Die Temperatur der Probe betrug dabei etwa  $T = 50^{\circ}\text{C}$ . Während dieses Vorgangs wurden zu bestimmten Zeiten mit Einwegspritzen Proben entnommen. Die Spritzen wurden mit einer Kanüle incl. Schutzhülle verschlossen, um einen Kontakt der Systeme mit der Umgebung zu verhindern. Zur Bestimmung des Wassergehalts wurden für jede Probe mindestens 3 Karl-Fischer-Titrations durchgeföhrt. Die Proben standen anschließend den physikochemischen Charakterisierungen zur Verfügung. Alle untersuchten Systeme befinden sich

demnach im Phasendiagramm (Abb. 2.17) auf der durch den roten Pfeil markierten Linie. Bei einem Wassergehalt von  $c_{aq} \approx 4\%$  fand ein Phasenübergang von einer trüben, lamellare Vesikel enthaltenen Lösung in eine klare, transparente invers mizellare Lösung statt. Je nach Phasenlage des Systems wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

1. Das System befand sich im Zustand, in dem lamellare Flüssigkristalle vorlagen. Durchgeführt wurden
  - (a) Beobachtung der makroskopischen Systemeigenschaften
  - (b) Polarisationsmikroskopische Untersuchung der Struktur
  - (c) Röntgenkleinwinkelbeugung
2. Das System befand sich im Zustand einer invers mizellaren Lösung. Folgende Messungen wurden durchgeführt:
  - (a) Makroskopische Beobachtung
  - (b) Photonenkorrelationsspektroskopie. Hierzu wurden die Proben 1:15 mit IPM verdünnt und anschließend gefiltert ( $d = 0.22 \mu\text{m}$ ).
  - (c) Röntgenkleinwinkelstreuung an den bereits verdünnten Proben

Im Bereich des Phasenübergangs fanden Messungen sowohl aus der ersten als auch aus der zweiten Gruppe statt. Die oben beschriebenen Messreihen wurden mit den in Tabelle 5.1 angegebenen Systemen durchgeführt. Alle prozentualen Arzneistoff- und Wassergehalte sind durchgehend als (m/m) angegeben.

### 5.1.1 Makroskopische Veränderungen der Systeme

Während des Messablaufs bei  $T = 50^\circ\text{C}$  fand eine optische Analyse der makroskopischen Eigenschaften der Systeme statt. Zur Abschätzung der Viskosität wurde die Zähigkeit bzw. Fließfähigkeit des Ansatzes während der Probenentnahme und anhand der Bewegung des Magnetrührers beobachtet.

Bei den **Systemen ohne Arzneistoff** konnte folgendes beobachtet werden:

- **$c_{aq} \approx 40\%$**  : Direkt nach der Zugabe des Wassers hat die noch nicht erhitzte Probe ein weißgelbes, buttermilchähnliches Aussehen. Nach Erhitzen auf  $T \approx 50^\circ\text{C}$  ergibt sich eine trüb-gelbe niedrigviskose Lösung.
- **$c_{aq} \approx 31\%$**  : Das System wird intensiver gelb und transparenter, bleibt aber relativ dünnflüssig.

Tabelle 5.1: Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Messreihen.  $c_{AS}$ : Konzentration an Arzneistoff.  $c_{aq}$ : Zu Beginn der Messreihe hinzugefügter Massenanteil Wasser. Die Angabe der Chargen bezieht sich auf Phospholipon<sup>R</sup> 90 G.

| Nr. | Arzneistoff                    | $c_{AS}[\%]$ | $c_{aq}[\%]$ | Anzahl $n$ | Besonderheiten                                      |
|-----|--------------------------------|--------------|--------------|------------|---|
| 1   | ohne Arzneistoff               | 0%           | 40%          | $n = 5$    | SAXS : $n = 4$<br>beide Chargen                     |
| 2   | Timolol-Hydrogenmaleat (TM)    | 0.5%         | 7.5%         | $n = 2$    | SAXD : $n = 1$<br>kein SAXS, Polmik<br>Ch-Nr. 90050 |
| 3   | Timolol-Hydrogenmaleat         | 2%           | 40%          | $n = 3$    | 1x $c_{aq} \approx 26\%$<br>beide Chargen           |
| 4   | Timolol-Hydrogenmaleat         | 4%           | 40%          | $n = 3$    | kein SAXS<br>Ch-Nr. 90050                           |
| 5   | Diclofenac-Natrium (DNa)       | 2%           | 40%          | $n = 2$    | –<br>Ch-Nr. 90080                                   |
| 6   | Pilocarpin-Hydrochlorid (PHCl) | 2%           | 40%          | $n = 3$    | SAXD: $n = 2$<br>Ch-Nr. 90080                       |

- $c_{aq} \approx 17 - 15\%$  : Die Lösung trübt wieder ein und wird zähflüssiger.
- $c_{aq} \approx 9\%$  : Die Probe wird langsam klar und transparent. Die Zähigkeit nimmt weiter zu.
- $c_{aq} \approx 8 - 4\%$  : Es entsteht eine hochviskose, gelartige, klare und transparente gelbe Lösung mit vielen Luftblasen. Bei Abfüllen in die Spritzen und nachfolgender Abkühlung auf Raumtemperatur findet eine Trübung des Systems statt. Nach einiger Zeit liegt die trübe Phase getrennt von einer klaren, niedrigviskosen Phase vor. In diesem Bereich findet der offenbar temperaturabhängige Phasenübergang von einem flüssigkristallinen in ein invers mizellares System statt.
- $c_{aq} \approx 3.5 - 0.5\%$  Die Fließfähigkeit der klaren Lösung nimmt mit abnehmendem Wassergehalt stark zu. Eine Eintrübung beim Abfüllen der Probe findet nicht mehr statt.

Zur Reproduzierbarkeit dieser Beobachtungen ist anzumerken, dass der Verlauf bei allen  $n = 5$  Messreihen der arzneistofffreien Systeme beobachtet wurde, die zugehörigen Wasserkonzentrationen gerade bei hohen  $c_{aq}$  jedoch leicht verschoben sein können. Die arzneistoffhaltigen Systeme zeigen teilweise abweichende makroskopische Eigenschaften, die im folgenden herausgestellt sind:

**Systeme mit Timolol-Hydrogenmaleat** in Konzentrationen von  $c_{AS} \geq 2\%$  sind bei  $c_{aq} > 30\%$  und  $T = 50^\circ\text{C}$  klarer und transparenter als die arzneistofffreien Systeme. Daneben tritt eine Präzipitation weißer Flocken auf. Im Polarisationsmikroskop weisen diese Flocken eine auf Myelinschläuche hindeutende Textur auf. Außerdem sind vereinzelt *oily streaks* und Malteserkreuze zu erkennen, so dass von einem Präzipitat lamellarer Flüssigkristalle ausgegangen werden kann (Abb. 5.1). Woraus diese Flüssigkristalle bestehen, konnte nicht ermittelt werden, da mit der Röntgenbeugung keine Strukturen aufgelöst werden konnten. Eine Zunahme der Zähigkeit ist bei  $c_{aq} \approx 25 - 30\%$  zu beobachten, die jedoch bei  $c_{aq} \approx 15\%$  bei gleichzeitiger Eintrübung wieder abnimmt. Der Phasenübergang in die invers mizellare Lösung findet bei im Vergleich mit den arzneistofffreien Systemen deutlich höherer Fließfähigkeit statt.

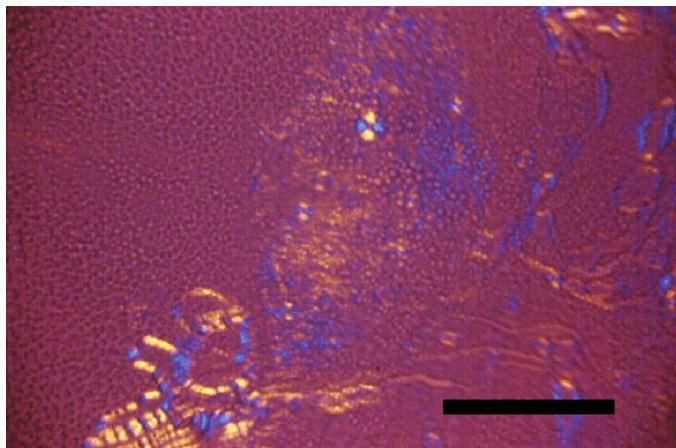


Abbildung 5.1: Polarisationsmikroskopische Aufnahme der ausfallenden weißen Flocken in den TM-haltigen ternären Systemen. Balken:  $50\ \mu\text{m}$ .

**Systeme mit Pilocarpin-Hydrochlorid** sind bei Wassergehalten von  $c_{aq} > 12\%$  weiß-gelb und opak, wobei die Gelbfärbung mit abnehmendem Wassergehalt zunimmt. Die Zähigkeit ist bei allen Wassergehalten relativ niedrig. Beim Phasenübergang ist die Fließfähigkeit gegenüber den arzneistofffreien Systemen leicht höher, allerdings hatten die Proben eine leimartige Konsistenz und zogen bei der Probenentnahme Fäden. Die Zunahme der Fließfähigkeit im Bereich  $c_{aq} = 3.5 - 0.5\%$  erscheint nicht so ausgeprägt wie bei den Systemen ohne Arzneistoff.

**Systeme mit Diclofenac-Natrium** zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Systeme mit Pilocarpin-HCl. Die Zähigkeit ist bei höheren Wassergehalten in Gegenwart von DNa jedoch merkbar höher. Bei hohen Wassergehalten sind die Proben transparenter als die PHCl-haltigen Systeme und weisen eine etwas intensivere Gelbfärbung auf.

Die Beobachtungen der makroskopischen Veränderungen der Systeme korrelieren weitgehend mit den in der Literatur beschriebenen rheologischen Untersuchungen. Schurtenberger et al. beobachteten bei Zunahme des Wassergehalts von  $w_0 = 0$  auf  $w_0 = 2 - 3$  einen massiven Viskositätsanstieg um 6 Größenordnungen in invers mizellaren Systemen von Lecithin in *i*-Octan [37]. Dieser deutliche Viskositätsanstieg ist Folge des Wachstums kurzer, isotroper Mizellen zu Spaghettimizellen. Dass inverse Lecithin-Mizellen im Lösungsmittel IPM ebenfalls gelartige Systeme mit massiver Viskositätserhöhung und damit aller Voraussicht nach auch Spaghettimizellen bilden, zeigten Scartazzini und Luisi [1]. Papantoniou [107], Müller [96] und Schneeweis [17] führten rheologische Experimente mit IPM-haltigen Systemen durch und konnten den Viskositätsanstieg bestätigen, der allerdings in IPM wesentlich niedriger ausfällt als in *i*-Octan. Bei Arzneistoffzugabe verringert sich der Viskositätsanstieg mit Ausnahme der PHCl-haltigen Systeme. Für diese fällt das Viskositätsmaximum bei kleinem Arzneistoffgehalt höher und erst bei höheren Arzneistoffgehalten  $c_{AS} = 3 - 4\%$  niedriger aus. Die gleichen Beobachtungen machte Friedrich an arzneistoffhaltigen Systemen mit mittelkettigen Triglyceriden als Lösungsmittel [116]. Der Phasenübergang des als Standard-IML bezeichneten arzneistofffreien Systems (Kap. 3.2) in die von Hamann definierte Phasenlage II (Abb. 2.17) kann auf einen Bereich von  $c_{aq} = 3 - 4.5\%$  eingeschränkt werden, was einem  $w_0 = 4.5 - 6.5$  entspricht. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Scartazzini und Luisi, die den Beginn der Viskositätszunahme, die bei etwas geringeren  $w_0$  als der Phasenübergang stattfindet [2], mit  $w_0 = 3$  für IPM angaben [1]. Wie bereits in Kap. 2 angesprochen, identifizierte Müller den hochviskosen Zustand im Phasenübergang durch rheologische Messungen als ein Sol. Ein Gelzustand liegt in den hochviskosen Systemen niemals vor [96].

### 5.1.2 Thermogravimetrische Untersuchung des Messvorgangs

Zur Quantifizierung des Evaporisationsvorgangs des Wassers aus den Proben wurden thermogravimetrische (TG)-Messungen durchgeführt. Die Standard-IML wurden mit ca. 40% Wasser versetzt und über einen Messzeitraum von  $t = 300$  min isotherm bei  $T = 47 \pm 1^\circ\text{C}$  vermessen. Während der dabei erfolgenden Evaporation wurden die Proben kontinuierlich gewogen. Messungen wurden für die Systeme ohne sowie mit 2% Arzneistoffbeladung durchgeführt. Alle Systeme wurden in zweifacher Ausführung hergestellt und je einmal vermessen.

Interpretation der Thermogramme:

- Systeme ohne Arzneistoff

Ein aus zwei Kinetiken zusammengesetztes Thermogramm ist zu erkennen

(Abb. 5.2). Die anfänglich sehr hohe Evaporisationsrate nimmt zu einem späteren Zeitpunkt abrupt ab. Das Wasser liegt in den arzneistofffreien Systemen offenbar in zwei Zuständen vor – einem stark gebundenen, langsam evaporisierenden und einem schwächer gebundenen, schnell evaporisierenden Zustand. Diese Beobachtung steht in Einklang mit dem Phasendiagramm von Hamann (Abb. 2.17), das einen Phasenübergang im Verlauf der Evaporation (roter Pfeil in Abb. 2.17) zeigt. Das Wasser liegt in Phase II demnach stärker gebunden vor als in Phase VI. Anzumerken ist, dass keine der beiden Kinetiken einer Kinetik 1. oder 2. Ordnung entspricht.

- Systeme mit 2% Timolol-Hydrogenmaleat

Ein zusammengesetzter Verlauf der Thermogramme – wie bei den arzneistofffreien Systemen zu beobachten – ist nur ansatzweise zu sehen (Abb. 5.3). Es sind zwei Ursachen für dieses Verhalten denkbar: entweder (a) das schwächer gebundene Wasser ist in geringeren Anteilen vorhanden als in den arzneistofffreien Systemen, oder (b) die Unterschiede zwischen den beiden Zuständen sind nur gering. Ein Phasenübergang wie bei den unbeladenen Systemen scheint auch hier vorhanden zu sein.

- Systeme mit 2% Diclofenac-Na bzw. 2% Pilocarpin-HCl

Diese Systeme zeigen ausnahmslos einen kontinuierlichen Evaporationsverlauf (Abb. 5.4– 5.5). Die Evaporisationsrate ist in den PHCl-haltigen Systemen deutlich höher als in den DNa-haltigen Systemen. In letzteren befanden sich bei Abschluss der TG-Messungen noch  $c_{aq} = 1.8 \pm 0.1\%$  Wasser. Aus den Kurvenverläufen der DNa-haltigen Systeme ist zudem zu erkennen, dass die Evaporation nach Ablauf der Messzeit noch nicht vollständig abgeschlossen war. Das Wasser liegt offenbar in den DNa-haltigen Systemen stärker gebunden vor als in den PHCl-haltigen Systemen. Auch die arzneistoffhaltigen Systeme gehorchen keiner Kinetik 1. oder 2. Ordnung.

- Systeme ohne Arzneistoffzugabe

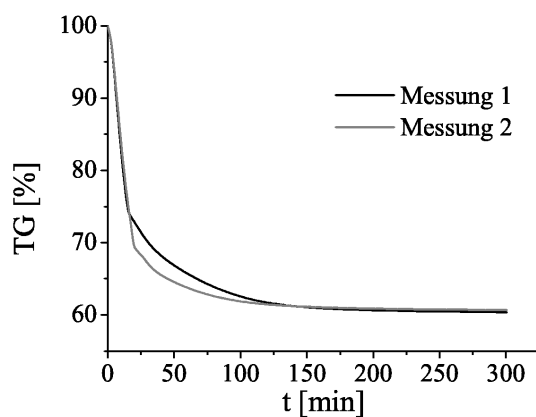


Abbildung 5.2: Isotherme thermogravimetrische Messung der arzneistofffreien Standard-IML.

| o. Arzneistoff | evaporisierter Massenanteil | hinzugefügter Wasseranteil |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|
| Probe 1        | 39.6%                       | 40.0%                      |
| Probe 2        | 39.3%                       | 40.0%                      |

- Systeme mit 2% Timolol-Hydrogenmaleat

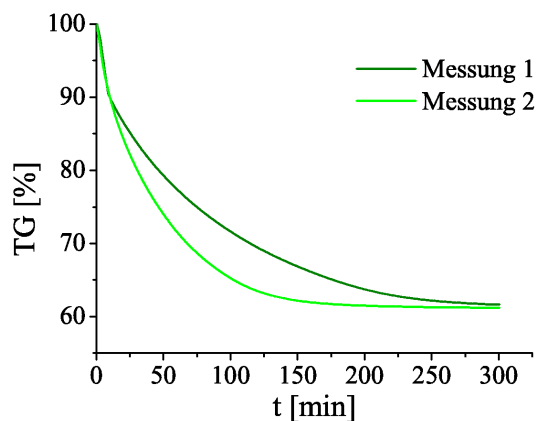


Abbildung 5.3: Isotherme thermogravimetrische Messung der Standard-IML mit 2% TM.

| +2% Timololmaleat | evaporisierter Massenanteil | hinzugefügter Wasseranteil |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Probe 1           | 38.9%                       | 39.3%                      |
| Probe 2           | 38.7%                       | 39.2%                      |



- **Systeme mit 2% Diclofenac-Natrium**

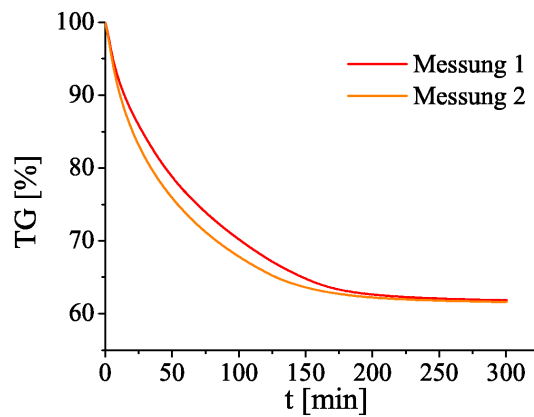


Abbildung 5.4: Isotherme thermogravimetrische Messung der Standard-IML mit 2% DNa.

| +2% Diclofenac-Na | evaporisierter Massenanteil | hinzugefügter Wasseranteil |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Probe 1           | 38.1%                       | 40.0%                      |
| Probe 2           | 38.3%                       | 40.0%                      |

- **Systeme mit 2% Pilocarpin-HCl**

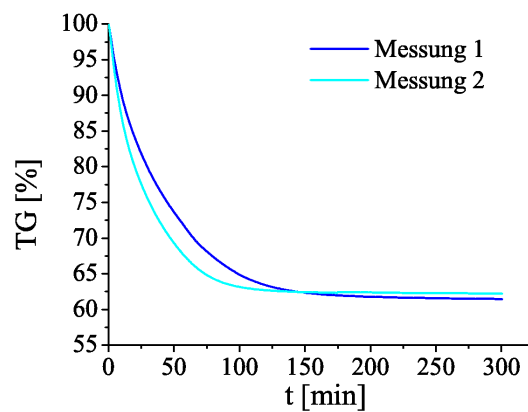


Abbildung 5.5: Isotherme thermogravimetrische Messung der Standard-IML mit 2% PHCl.

| +2% Pilocarpin-HCl | evaporisierter Massenanteil | hinzugefügter Wasseranteil |
|--------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Probe 1            | 38.4%                       | 39.1%                      |
| Probe 2            | 37.8%                       | 39.1%                      |

Die Reproduzierbarkeit der Kurven ist begrenzt. So sind z.B. die zwei unterschiedlichen Kinetiken bei den TM-haltigen Systemen nur in einem der beiden Thermogramme zu unterscheiden. Als Gründe für die schwache Reproduzierbarkeit sind die vorhandenen Differenzen in der abgefüllten Masse und das damit variierende Oberflächen-Volumen-Verhältnis sowie beginnende Phasentrennungen der Systeme vor dem Abfüllen der Proben zu diskutieren.

### 5.1.3 Abhängigkeit der Mizellgröße von der Probenpräparation

Da die Probenbereitung nicht immer unter absolut konstanten Bedingungen erfolgen konnte, wurde untersucht, ob der Herstellungsprozess der IML kritisch bzgl. der physiko-chemischen Eigenschaften der Systeme ist. Als Messgröße wurde der aus der PCS resultierende hydrodynamische Durchmesser der Mizellen verwendet, da dieser besonders empfindlich auf Veränderungen der Systeme reagiert. Timolol-Hydrogenmaleat lässt sich sowohl über die wässrige Stammlösung als auch als Feststoff in die Standard-IML einarbeiten und wurde deshalb als Modellarzneistoff für diese Studie ausgewählt.

Tabelle 5.2: Wassergehalt und Partikelgröße der TM-haltigen inversen Mizellen, die auf verschiedene Arten hergestellt wurden,  $n = 3$ .

| TM [%] | Stammlösung | $c_{aq}$ [%]    | $d$ [nm]       |
|--------|-------------|-----------------|----------------|
| 0.0    | –           | $0.98 \pm 0.01$ | $19.6 \pm 1.2$ |
| 0.5    | 6.25%       | $1.10 \pm 0.33$ | $16.8 \pm 0.7$ |
| 0.5    | 2.0%        | $0.99 \pm 0.20$ | $15.7 \pm 0.9$ |
| 0.5    | fest*       | $1.05 \pm 0.17$ | $16.2 \pm 1.2$ |
| 2.0    | 2.0%        | $1.19 \pm 0.52$ | $11.1 \pm 1.4$ |
| 2.0    | fest*       | $0.94 \pm 0.24$ | $9.3 \pm 0.8$  |
| 4.0    | 6.25%       | $0.72 \pm 0.32$ | $6.7 \pm 1.0$  |

\* Einarbeitung des festen TM in die IML.

Hergestellt wurden Proben mit Arzneistoff-Konzentrationen von 0%, 0.5%, 2% und 4% TM. Die Einarbeitung in die Standard-IML erfolgte entweder über wässrige Stammlösungen mit 6.25% bzw. 2% Arzneistoffgehalt und anschließender Evaporisation des Wassers, oder durch eine direkte Solubilisation des kristallinen TM in die IML. Alle Proben wurden in dreifacher Ausfertigung hergestellt. Messgrößen sind der mit Karl-Fischer-Titration ermittelte Wassergehalt und der hydrodynamische Durchmesser  $d$ . Die Resultate in Tabelle 5.2 zeigen eine von der Art der Herstellung unabhängige Mizellgröße. Die

Herstellungsart ist somit unkritisch für die resultierenden invers mizellaren Systeme. Zudem ist der mit zunehmendem Gehalt an TM abnehmende hydrodynamische Durchmesser  $d$  deutlich erkennbar, ebenso wie ein andeutungsweises Anwachsen der Mizellen mit zunehmendem Wassergehalt. Weiterhin zeigen diese Resultate, dass das Wasser bis zu einem Restgehalt von  $c_{aq} \approx 1\%$  unabhängig von der Art der Präparation aus den Systemen entfernt werden kann.

## 5.2 Untersuchung der flüssigkristallinen Phase

Wie aus dem Phasendreieck nach Hamann (Abb. 2.17) ersichtlich, enthalten die Systeme der Phasenlagen II und VI lamellare Strukturen [18]. Als Untersuchungsmethoden für diese Systeme wurden folglich Röntgenkleinwinkelbeugung und Polarisationsmikroskopie eingesetzt. Anhand der aufgenommenen Texturen und Strukturen werden die Systeme in den nächsten Abschnitten bewertet. Zur Diskussion stehen (a) der Einfluss des Arzneistoffs Timolol-Hydrogenmaleat in unterschiedlich hohen Konzentrationen, sowie (b) der Vergleich der Einarbeitung dreier verschiedener Arzneistoffe – Pilocarpin-HCl, Diclofenac-Na und Timolol-Hydrogenmaleat.

### 5.2.1 Einfluss der Arzneistoffkonzentration auf den lamellaren Flüssigkristall

In diesem Abschnitt findet ein Vergleich der Systeme mit unterschiedlicher Konzentration des Modell-Arzneistoffs Timolol-Hydrogenmaleat statt. Der Arzneistoffgehalt variiert zwischen  $c_{AS} = 0\%$  und  $c_{AS} = 4\%$ , je nach System wurden Wassergehalte vom Phasenübergang in die IML bei  $c_{aq} \approx 4\%$  bis hinauf zu Wassergehalten von  $c_{aq} = 40\%$  untersucht. Genaue Informationen über die Systeme sind Tabelle 5.1 zu entnehmen. Für die Herstellung der Proben wurde Lecithin der Charge Nr. 90050 verwendet.

#### 5.2.1.1 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen

Die aus der Polarisationsmikroskopie erhaltenen Texturaufnahmen der arzneistofffreien Systeme befinden sich im Einklang mit den makroskopischen Veränderungen der Systeme und den von Hamann postulierten Phasenlagen (Abb. 5.6a-c). In Phasenlage VI liegt demnach eine W/O-Emulsion in Koexistenz mit einer lamellaren Mesophase vor [18]. Ein Nachweis dieser drei Phasen ist für ein System mit 0% TM und 40% Wasser in Abb. 5.6a gegeben: Es sind Emulsionströpfchen mit malteserkreuzähnlichen Texturen in der Grenzschicht zu erkennen. Die lamellaren Bereiche scheinen somit in

den Grenzflächen zu sein. Der W/O-Charakter wurde durch einen Anfärbetest bestätigt. Den Phasenübergang in Phasenlage II bei  $c_{aq} = 28\%$  zeigt Abb. 5.6b: Der Emulsionscharakter verschwindet und Anzeichen lamellarer Strukturen nehmen leicht zu. Ein Beispiel für ein arzneistofffreies System mit niedrigem Wassergehalt von  $c_{aq} = 7.5\%$  ist in Abb. 5.6c mit ausgedehnten *oily streaks* zu erkennen. Diese bei Raumtemperatur relativ viskosen und trüben Systeme enthalten demzufolge große Bereiche geordneter Phospholipid-Multilayer. Die bei weiterer Reduktion des Wassergehalts auf  $c_{aq} \approx 4\%$  erhaltenen hochviskosen, klaren Systeme zeigen keine doppelbrechenden Eigenschaften. Sie geben unter dem Polarisationsmikroskop ein textur- und strukturloses einfarbiges Bild.

Systeme, die 2% TM enthalten, zeigen bei  $c_{aq} = 24\%$  in der Polarisationsmikroskop-Aufnahme eine Struktur, die der einer Creme ähnelt [179]. Neben dieser Struktur sind vereinzelte Malteserkreuze zu beobachten, die auf isolierte lamellare Vesikel hindeuten (Abb. 5.6d). Bei niedrigem Wassergehalt ( $c_{aq} = 7.5\%$ ) sind *oily streaks* und Malteserkreuze die dominierende Struktur (Abb. 5.6e). Eine Abbildung der Systeme mit 4% TM zeigt eine Emulsion ohne das geringste Anzeichen von Texturen bei  $c_{aq} = 36\%$ , ein ganz vereinzeltes Auftreten von Malteserkreuzen in der cremeähnlichen Struktur bei  $c_{aq} = 23\%$  sowie ein gehäuftes Auftreten von Malteserkreuzen in Abwesenheit von *oily streaks* bei  $c_{aq} = 5.5\%$  (Abb. 5.6f-h).

Der Übergang von der W/O-Emulsion bei hohen  $c_{aq}$  zu einem cremeähnlichen System wird durch den beobachteten Viskositätsanstieg bei Wasserabnahme untermauert. Die Viskosität nimmt erst bei Wassergehalten von  $c_{aq} \approx 15\%$  wieder ab. Hier geht die cremeähnliche Struktur in eine lamellare Vesikeldispersion über. Das vermehrte Auftreten von Malteserkreuzen und die niedrigere Viskosität bei den TM-haltigen Systemen zeigt, dass die Ausbildung stark geordneter flüssigkristalliner Bereiche durch das TM gestört wird. Die Addition von Timolol-Hydrogenmaleat zu den ternären Lecithin/IPM/Wasser-Systemen verändert die Phasenlage der Systeme entscheidend. Das von Hamann postulierte Phasendiagramm (Abb. 2.17) hat bei den TM-haltigen Systemen keine Gültigkeit mehr. Von Kleinsorgen (zitiert nach Hamann [18]) zeigte, dass bei Einwirken starker Dispersionskräfte das ternäre System stabile Cremes bildet. Timolol-Hydrogenmaleat scheint diesen Prozess zu unterstützen.

#### 5.2.1.2 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

Weitere Informationen über die Struktur der lamellaren Flüssigkristalle sind aus den Netzebenenabständen der Multilayer zugänglich. Diese können mittels Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) ermittelt werden. Die SAXD-Messungen wurden mit einer

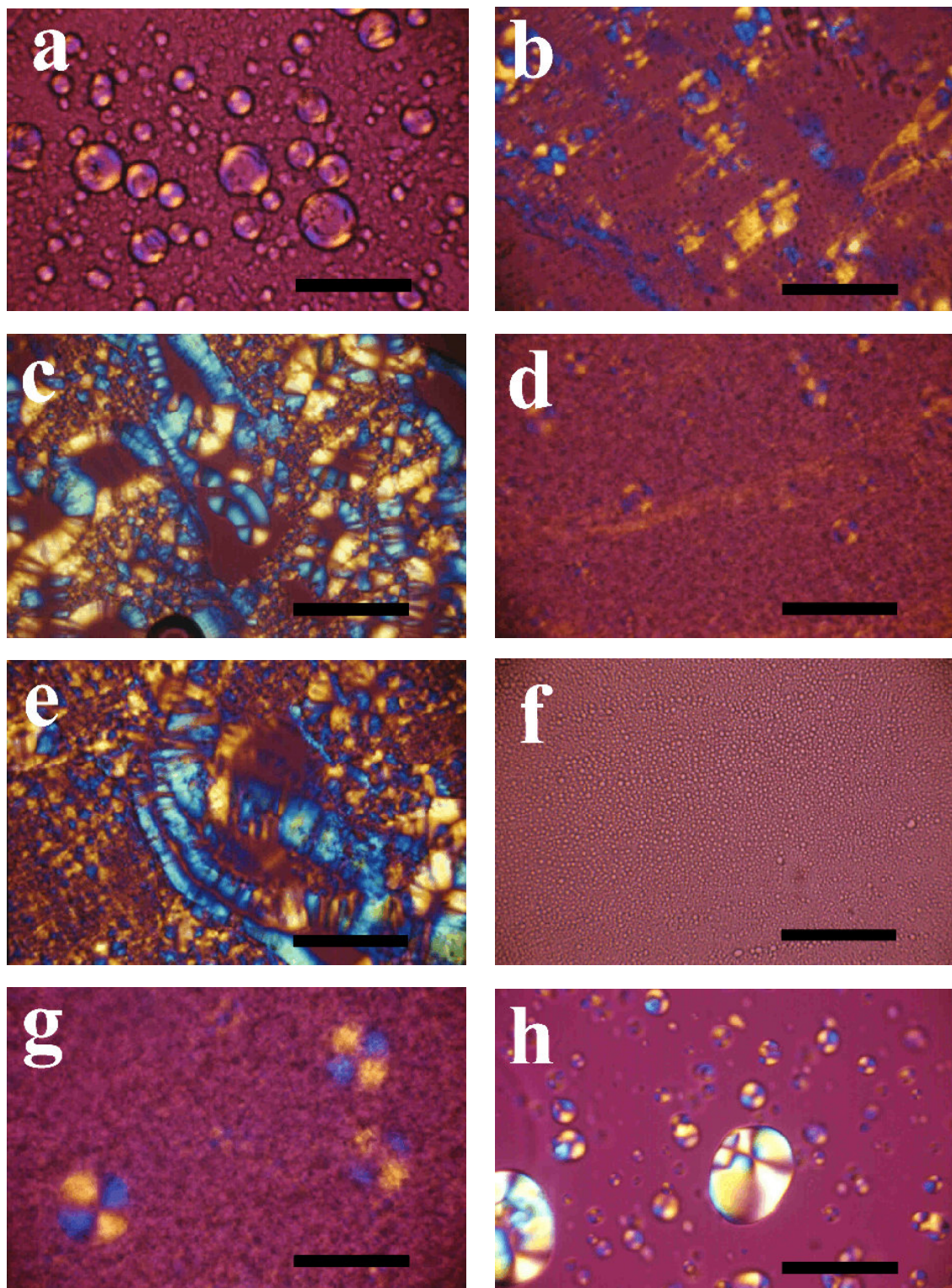


Abbildung 5.6: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Systeme ohne Arzneistoff mit 40% (a), 28% (b) und 7.5% Wasser (c), Systeme mit 2% TM und 24% (d) und 7.5% Wasser (e), sowie Systeme mit 4% TM und Wassergehalten von 36% (f), 23% (g) und 5.5% (h). Balken: 50 $\mu$ m

Kiessig-Lochblendenkamera bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine zusätzliche Temperierung fand hier nicht statt. Aus den Interferenzen kann mittels der Bragg'schen Beziehung der Netzebenenabstand  $d$  berechnet werden. Die Beugungskurven zeigen 2-3 Reflexe, wobei das Maximum 1. Ordnung am ausgeprägtesten ist. In allen Beugungskurven entsprechen die Interferenzen der Reflexfolge  $1 : 1/2 : 1/3$ , die für lamellare Flüssigkristalle charakteristisch ist [102]. Somit können die aus der Polarisationsmikroskopie erhaltenen Resultate, die ausschließlich lamellare Mesophasen zeigen, bestätigt werden.

### Vergleich der Systeme mit variabler Arzneistoffkonzentration

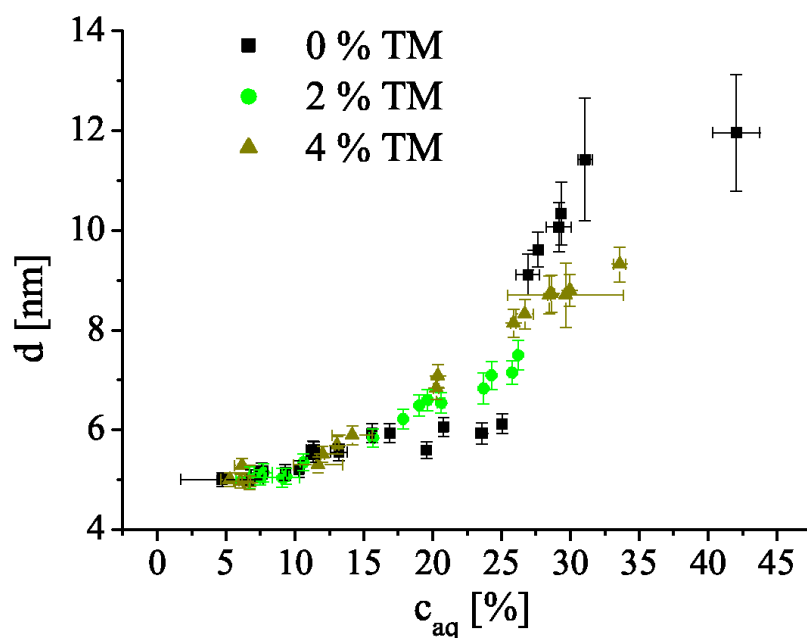


Abbildung 5.7: Netzebenenabstände  $d$  der in den Systemen mit 0%, 2% und 4% TM enthaltenen lamellaren Flüssigkristalle.

In Abhängigkeit vom Wassergehalt in den ternären Lecithin/IPM/Wasser-Systemen findet durch die Hydratation des Lecithins eine Aufweitung der lamellaren Strukturen und somit eine Vergrößerung des Netzebenenabstands  $d$  statt. Einen Vergleich der Proben mit 0%, 2% und 4% TM zeigt Abb. 5.7. Der Einfluss des Arzneistoffs Timololmaleat wird erst bei Wassergehalten von  $c_{aq} > 18\%$  deutlich. In den arzneistofffreien Systemen steigt  $d$  bis zu einem Wassergehalt von  $c_{aq} \approx 27\%$  nur leicht an. Der Phasenübergang von einer lamellaren Mesophase (Phasenlage II) in ein dreiphasiges W/O-System (Phasenlage VI) (Abb. 2.17) ist für die arzneistofffreien Systeme am sprunghaften

Anstieg des Netzebenenabstands bei  $c_{aq} \approx 27\%$  zu erkennen. Bei den TM-haltigen Systemen hingegen ist eine im Vergleich zu den arzneistofffreien Systemen stärkere Aufweitung der lamellaren Mesophasen in Gegenwart des Arzneistoffs zu beobachten. Außerdem bleibt der Phasenübergang bei den Systemen mit 4% TM aus; der Anstieg des Netzebenenabstands verläuft hier kontinuierlich. Die Erkenntnis aus den polarisationsmikroskopischen Untersuchungen, dass das Phasenverhalten des ternären Lecithin/IPM/Wasser-Systems in Gegenwart von TM nachhaltig verändert wird, wird mit diesen Resultaten untermauert. Die Systeme mit 2% TM wurden in dieser Messreihe nur bis zu einem Wassergehalt von  $c_{aq} = 26\%$  gemessen, so dass keine Aussage über einen möglichen Phasenübergang gemacht werden kann. Spätere Messreihen zum Vergleich dreier Arzneistoffe zeigen jedoch, dass dieser durch ein sprunghaftes Anwachsen des Netzebenenabstands erkennbare Phasenübergang bei den Systemen mit 2% TM auftritt, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei den arzneistofffreien Systemen.

### Diskussion der SAXD-Kurven am Beispiel des Systems mit 4% Timolol-Hydrogenmaleat

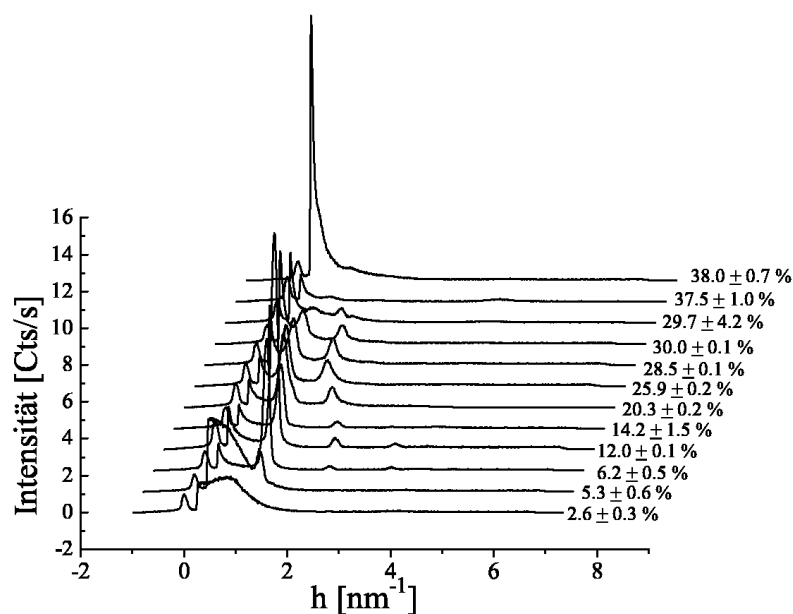


Abbildung 5.8: SAXD-Beugungsbilder der lamellaren Systeme mit 4% TM mit unterschiedlichen Wassergehalten von  $c_{aq} = 38.0\%$  bis herunter zu  $c_{aq} = 5.3\%$ . Aus den Streuvektoren  $h$  lässt sich über die Bragg'sche Beziehung der Netzebenenabstand  $d$  berechnen.

Abb. 5.8 zeigt die Abhängigkeit der Beugungskurven vom Wassergehalt der Systeme.



Systeme mit mehr als  $c_{aq} \approx 35\%$  Wasseranteil zeigen neben einer diffusen Streuung zu sehr kleinen Winkeln keine Beugungsreflexe. In diesem Bereich liegt eine W/O-Emulsion vor (Vergl. Abb. 5.6f). Bei niedrigeren Wassergehalten sind Reflexe 1. und 2. Ordnung erkennbar, deren Lage mit abnehmendem Wassergehalt zu höheren  $h$ -Werten driftet. Da sich die Netzebenenabstände  $d$  nach Bragg reziprok zu den Beugungswinkeln  $\vartheta$  verhalten, nimmt  $d$  – wie in Abb. 5.7 dargestellt – zu geringeren Wassergehalten hin ab. Ab einem Wassergehalt von  $c_{aq} \approx 12\%$  abwärts tritt ein Maximum 3. Ordnung auf, was auf einen höheren Ordnungszustand schließen lässt. Hier ist der Übergang vom cremeartigen System mit vereinzelt Strukturen zum relativ geordneten, lamellaren System vollzogen. Dass bei Wassergehalten von  $c_{aq} = 5.5\%$  nur noch das Maximum 1. Ordnung zu erkennen ist, liegt daran, dass die lamellare Ordnung im Grenzbereich zur invers mizellaren Lösung deutlich abnimmt. In diesem Fall liegen ölige Dispersionen lamellarer Partikel vor. Ob diese Partikel nach Hamann's Annahme Vesikel inverser Struktur [18] oder Bruchstücke vormals ausgedehnter lamellarer Bereiche sind, ist nicht abschließend zu klären. Systeme mit geringerem Wassergehalt zeigen nur noch eine diffuse Streukurve zu kleinen Winkeln, was auf ein ungeordnetes System hindeutet. Die lt. Schurtenberger et al. in diesem Bereich vorliegenden verknäuelten Spaghettimizen weisen keine Anzeichen von Ordnungszuständen auf [2].

## 5.2.2 Einfluss verschiedener Arzneistoffmoleküle auf die Mesophase

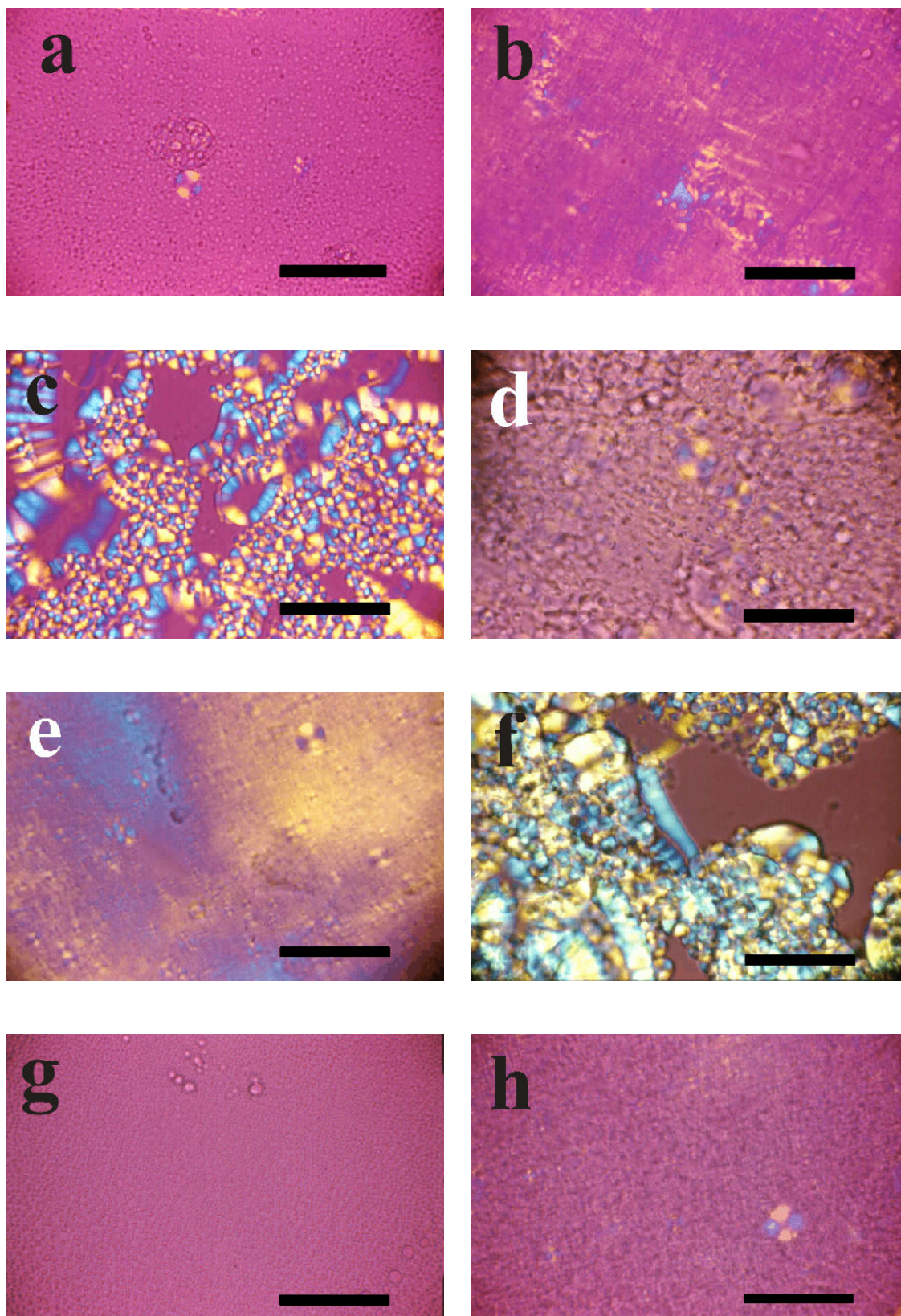
Die drei Modell-Arzneistoffe Diclofenac-Natrium (DNa), Pilocarpin-HCl (PHCl) und Timolol-Hydrogenmaleat (TM) wurden in Konzentrationen von  $c_{AS} = 2\%$  wie in Kap. 3.2 beschrieben in die Systeme eingearbeitet. Der Wassergehalt betrug zu Beginn einer Messreihe  $c_{aq} = 40\%$ . Das Wasser wurde nachfolgend aus den Proben durch Evaporisation entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Arzneistoffe auf die Phasenlage und die Struktur der ternären Systeme dienten Polarisationsmikroskopie und Röntgenkleinwinkelbeugung. Zur Herstellung der Proben wurde Lecithin der Charge Nr. 90080 verwendet. Die Systeme sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

### 5.2.2.1 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen

In Abb. 5.9 sind die Aufnahmen aus der Polarisationsmikroskopie für die untersuchten Systeme zusammengestellt. Für die Systeme ohne Arzneistoff sowie die Systeme mit 2% TM können die im vorigen Abschnitt erhaltenen Resultate weitestgehend reproduziert werden (Abb. 5.9 a-c;g-i).

- In den arzneistofffreien Systemen liegt bei hohen Wassergehalten eine Emulsion mit sehr vereinzelt auftretenden Texturen vor (a). Der Übergang in ein lamellares





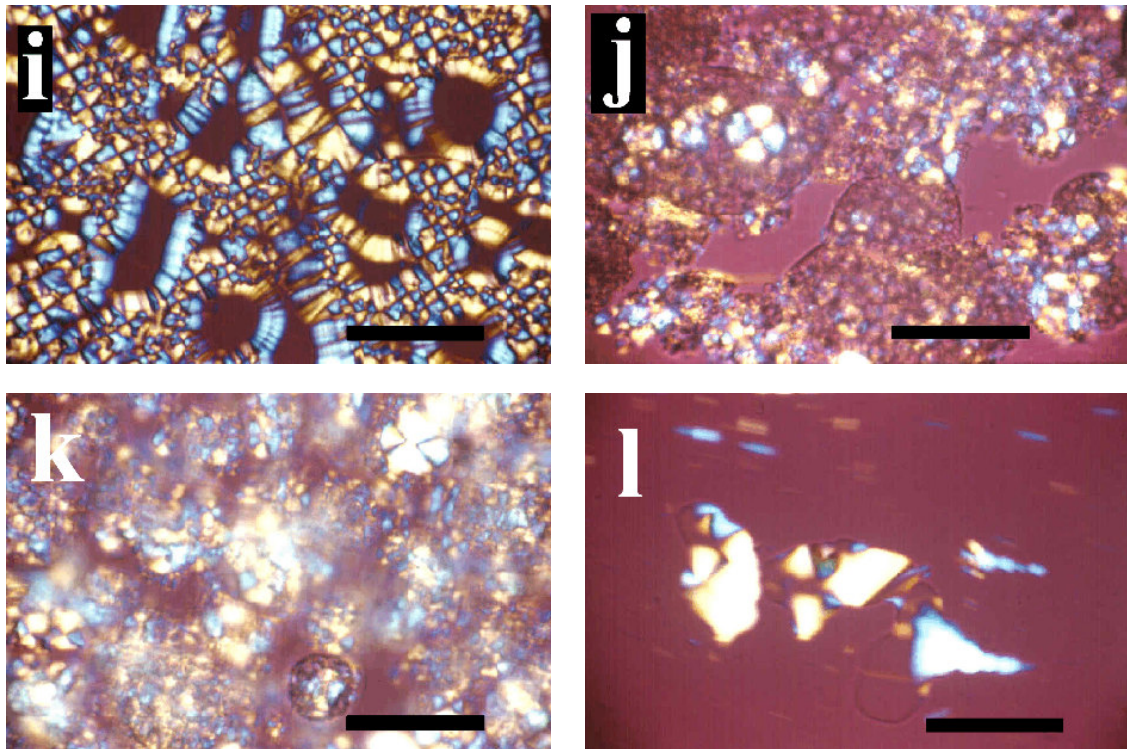


Abbildung 5.9: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Systeme ohne Arzneistoff mit 34% (a), 22% (b) und 5% (c) Wasser; Systeme mit 2% DNA und 38% (d), 18% (e) und 4% (f) Wasser; Systeme mit 2% TM und 30% (g), 24% (h) und 6.5% (i) Wasser; Systeme mit 2% PHCl und 37% (j), 13% (k) und 4% (l, verwickelt) Wasser. Balken: 50 $\mu$ m.

System bei mittleren Wassergehalten (b) sowie die ausgedehnten lamellaren Mesophasen bei geringem Wasseranteil (c) lassen sich auch in dieser Messreihe wiederfinden. Das etwas veränderte Erscheinungsbild der Emulsion (a) zu Abb. 5.6 (a) kann durch geringe Unterschiede im Messvorgang (z.B. Rührgeschwindigkeit, Umgebungstemperatur) zu erklären sein.

- Die Systeme mit 2% TM sind bei hohen Wassergehalten völlig frei von Texturen (g). Ein Phasenübergang in ein cremeähnliches System mit vereinzelt Vesikeln, erkennbar an den Malteserkreuzen erfolgt zu geringeren Wassergehalten (h). Bei niedrigem Wasseranteil dominieren die lamellaren Vesikel, die durch die Malteserkreuzen charakterisiert sind (i).
- Einen schwer zu interpretierenden Texturwandel zeigen die mit DNA beladenen Systeme (Abb. 5.9 d-f). Bei hohen Wassergehalten ist eine cremeartige Struktur mit vereinzelt Malteserkreuzen zu erkennen (d). Die Anzahl der Malteserkreuzen nimmt mit abnehmendem Wasseranteil zu, daneben tritt eine flächige Textur auf (e), die eigentlich auf eine sich ausbildende Hexagonalstruktur hindeutet. Diese konnte jedoch in der Röntgenkleinwinkelbeugung nicht einmal andeutungsweise



se erkannt werden. Ein Erklärungsansatz für diese als flächige, optisch anisotrope „Placken“ erscheinende Textur könnten ausgedehnte, hoch geordnete lamellare Flüssigkristalle sein, deren optische Achse mit dem einfallenden Licht einen definierten Winkel einschließt, so dass großflächige einfarbige Bereiche resultieren.

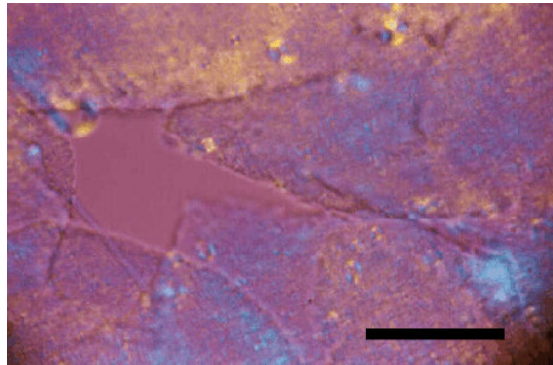


Abbildung 5.10: Polarisationsmikroskopische Aufnahme eines Systems mit 2% DNA und 9.5% Wasser. Zu erkennen sind mehrere, wie Eisschollen an- und übereinandergelagerte „Placken“, die sich in einer äußeren, isotropen Ölphase befinden. Balken: 50  $\mu\text{m}$ .

Einen Hinweis auf die Existenz solcher Placken findet man in Abb. 5.10, die darüber hinaus eine Phasengrenze zwischen den Placken und einer äußeren Phase erkennen lässt. Auch in den wasserarmen Systemen (f) ist zu sehen, dass sich die Malteserkreuze nicht über das ganze Bild erstrecken, sondern an bestimmte Bereiche gebunden sind. Die Plackenstruktur scheint also bis zum Phasenübergang in die IML erhalten zu bleiben.

- Eine Plackenstruktur ist bei den Systemen mit PHCl (Abb. 5.9 j-l) bei allen untersuchten Wasseranteilen zu erkennen. Diese Placken weisen jedoch im Gegensatz zur flächigen Textur der DNA-haltigen Systeme eine größere Anzahl an aus konzentrischen Defekten resultierenden Malteserkreuzen auf. Bei hohem Wassergehalt (j) sind deutlich mehr Texturelemente vorhanden als in den drei anderen Systemen, was auf einen höheren Anteil flüssigkristalliner Bereiche hinweist. Diese Bereiche konzentrieren sich auf eine Phase, die in Form der bereits angesprochenen Placken in einer Ölphase dispergiert ist. Des weiteren sind in diesen Systemen keine wesentlichen Unterschiede zwischen hohem (j) und mittlerem Wassergehalt (k) zu erkennen. Erst beim Übergang in eine invers mizellare Lösung lösen sich die lamellaren Strukturen auf. Man erkennt einzelne Malteserkreuze in der öl-isotropen Lösung, die auf der Aufnahme verwackelt erscheinen (l), was auf eine hohe Fließfähigkeit der kontinuierlichen Phase hindeutet.

Das Einarbeiten von 2% Arzneistoff in das ternäre System Lecithin/IPM/Wasser lässt einen großen Einfluss auf das Phasenverhalten des Systems erkennen. Während der Phasenübergang von Phasenlage II in Phasenlage VI beim TM noch stattfindet, bleibt er beim DNA und beim PHCl völlig aus. Setzt man das TM in Konzentrationen von 4% hinzu, verschwindet der Phasenübergang ebenfalls (Abb. 5.7) und es entsteht ein cremeähnliches System. Beim DNA scheint bei hohen Wassergehalten ebenfalls ein Cremesystem zu existieren, in den PHCl-haltigen Systemen liegt scheinbar ausschließlich die Phasenlage II (lamellare Bereiche in öliger Phase) vor. Die Texturbilder der DNA- bzw. PHCl-haltigen Systeme korrelieren mit den makroskopischen Beobachtungen, die keine wesentlichen Veränderungen während des Evaporierens des Wassers zeigen, sowie den Resultaten aus der Thermogravimetrie, die nur einen Bindungszustand des Wassers in den Mesophasen erkennen lassen. Dass TM erst in hohen Konzentrationen einen wesentlichen Einfluss auf das Phasenverhalten hat, kann an den molaren Verhältnissen zwischen Arzneistoff und Lecithin liegen. Dieses Verhältnis ist bei 2% TM mit 0.13 etwas niedriger als beim DNA mit 0.17. Eventuell ist ein bestimmtes molares Verhältnis zwischen Fremdschubstanz und Lecithin nötig, um die Struktureigenschaften nachhaltig zu verändern.

#### 5.2.2.2 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

Die SAXD-Messungen dieser Messreihe wurden mit einer Kratky-Kleinwinkelkamera mit Block-Kollimationssystem und einem temperierbaren Küvettenhalter durchgeführt. Die Proben wurden bei  $T = 25^{\circ}\text{C}$  gemessen. Die enthaltenen Beugungskurven wurden mit der ITR-Methode von Glatter und Gruber [178] entschmiert (Kap. 4.6). Die entschmierten Beugungsbilder sind in Abb. 5.11– 5.14 zu sehen. Alle Interferenzmuster entsprechen aufgrund ihrer Reflexfolge denen lamellarer Mesophasen. Bei sehr hohen und sehr niedrigen Wassergehalten ist oftmals nur eine einzige Interferenz zu erkennen. Da die zugehörigen Texturen eindeutig für lamellare Phasen sprechen, wurde diese Interferenz als 1. Interferenzmaximum einer lamellaren Struktur angenommen.

Die Beugungsbilder der **arzneistofffreien Systeme** (Abb. 5.11) zeigen für hohe Wassergehalte nur ein kleines, unscharfes Maximum bei sehr kleinen Streuwinkeln (in den Grafiken dargestellt durch den Streuvektor  $h$ ). Die unscharfen Peaks deuten auf wenig geordnete Strukturen hin. Bei etwa 25% Wasseranteil findet der Phasenübergang in ein lamellares System statt. Das Maximum 1. Ordnung ist ab hier bei deutlich größeren Winkeln zu finden. Es bilden sich außerdem Interferenzen der 2. und 3. Ordnung, deren Schärfe mit abnehmendem Wassergehalt zunimmt. Die Interferenzen verschieben sich kontinuierlich leicht zu größeren Streuvektoren  $h$ , was auf eine abnehmende lamellare Schichtdicke hinweist. Ab  $c_{aq} = 10\%$  werden die Beugungsmaxima unschärfer und verschwinden mit dem Übergang in eine IML vollends.

Die mit **2% Diclofenac-Na** beladenen Systeme (Abb. 5.12) zeigen bei allen untersuchten Wassergehalten Maxima 1. und 2. Ordnung, die mit abnehmendem Wassergehalt relativ deutlich zu größeren  $h$ -Werten driften. Dieser Effekt suggeriert eine deutliche Abnahme der Schichtdicke mit abnehmendem Wasseranteil. Ein Phasenübergang ist, wie aufgrund der Polarisationsmikroskop-Aufnahmen erwartet, den Kurven nicht zu entnehmen. Ebenfalls nicht zu erkennen sind hexagonale Strukturen, wie sie infolge der flächigen Texturen hätten erwartet werden können (Abb. 5.9e). Im Bereich des Übergangs in die IML (Messungen bei  $c_{aq} = 6.2\%$  und  $c_{aq} = 3.9\%$ ) reduziert sich die Beugungskurve auf ein einzelnes, sehr scharfes 1. Maximum, das dann mit abnehmendem Wassergehalt (Übergang in die ungeordnete IML bei  $c_{aq} = 3.9\%$ ) jedoch wieder an Intensität und Schärfe verliert.

Bei den Systemen mit **2% Timolol-Hydrogenmaleat** ist ein Phasenübergang analog zu den arzneistofffreien Systemen zu beobachten (Abb. 5.13). Bei hohen Wassergehalten sind die Beugungsbilder mit denen der arzneistofffreien Systeme weitgehend identisch. Im Bereich von  $c_{aq} = 28 - 30\%$  verschwindet plötzlich jegliche Struktur, was auch auf den polarisationmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist (Abb. 5.9g). Ab  $c_{aq} \approx 27\%$  bilden sich dann ähnlich wie bei den arzneistofffreien Systemen Interferenzen 1.- 3. Ordnung aus, deren Position sich mit abnehmendem Wassergehalt zu höheren  $h$  verschiebt. Bei  $c_{aq} = 5.1\%$  ist neben einer sehr unscharfen Interferenz ein diffuser Halo bei kleinen Streuvektoren zu erkennen, der durch konzentrierte Lecithin-Spaghettizellen verursacht wird [92]. Hier findet der Übergang von einer lamellaren Vesikeldispersion in die IML statt.

Systeme mit **2% Pilocarpin-HCl** scheinen sich in Abhängigkeit vom Wassergehalt nur sehr wenig zu verändern (Abb. 5.14). Neben einer relativ scharfen Interferenz 1. Ordnung sind Interferenzen 2. und teilweise auch 3. Ordnung nur sehr schwach ausgeprägt, so dass sie nur bei 50facher Vergrößerung erkennbar sind. Die Positionen der Interferenzmaxima bleiben bei abnehmendem Wassergehalt nahezu konstant; die Verschiebung zu größeren  $h$ -Werten ist sehr gering. Die bei den arzneistofffreien Systemen beobachtete Unschärfe der Interferenzen zu sehr geringen Wasseranteilen fällt hier schwächer aus. Die Beugungskurven korrelieren mit den Erkenntnissen aus der Polarisationsmikroskopie (Abb. 5.9j-k), die ebenfalls keine wesentliche Veränderung der Systeme mit abnehmendem Wassergehalt zeigten.

Anzumerken ist, dass in den Beugungsbildern der TM-haltigen Systeme bei Wassergehalten von  $c_{aq} \approx 30\%$  ein relativ ausgeprägtes 1. Maximum bei  $h = 0.25 - 0.3 \text{ nm}^{-1}$  auftritt,

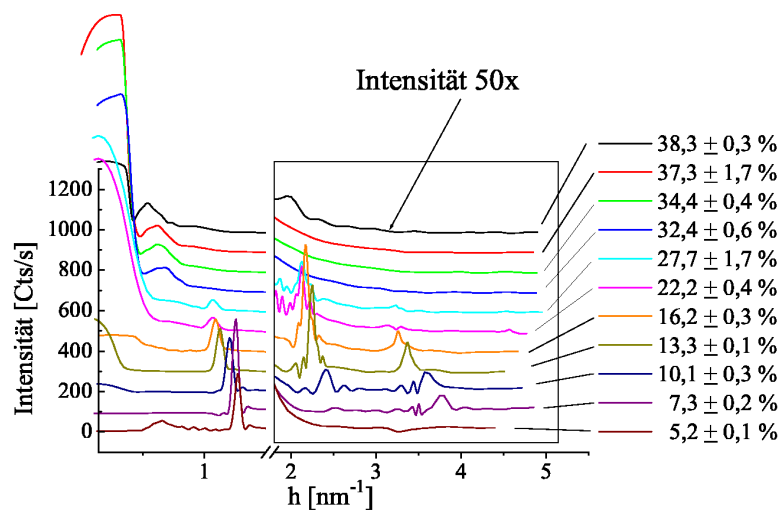


Abbildung 5.11: Entsmierte SAXD-Beugungsbilder der ternären Systeme Lecithin/IPM/Wasser ohne Arzneistoffzugabe bei verschiedenen Wassergehalten [%]. Zur besseren Darstellung der Interferenzen höherer Ordnung wurden die Intensitäten für  $h > 1.6 \text{ nm}^{-1}$  um den Faktor 50 vergrößert.

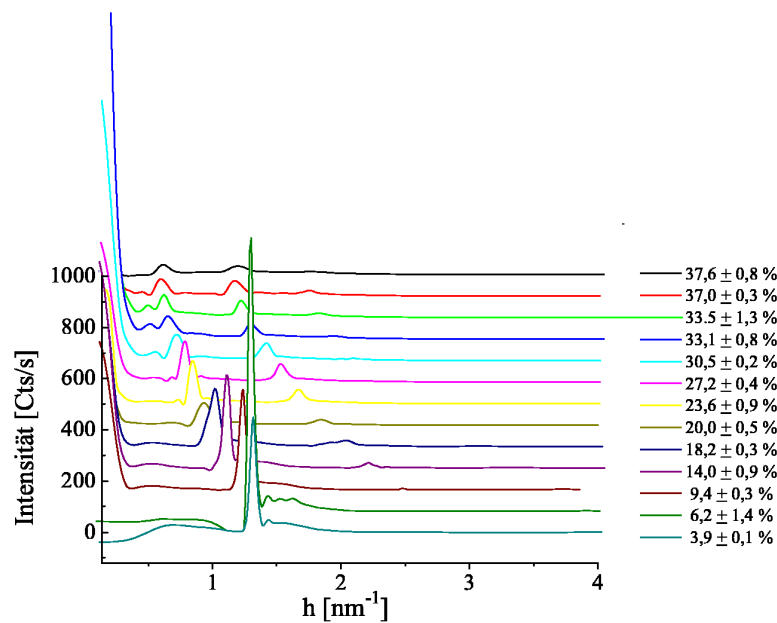


Abbildung 5.12: Entsmierte SAXD-Beugungsbilder der ternären Systeme mit 2% DNA bei verschiedenen Wassergehalten [%].

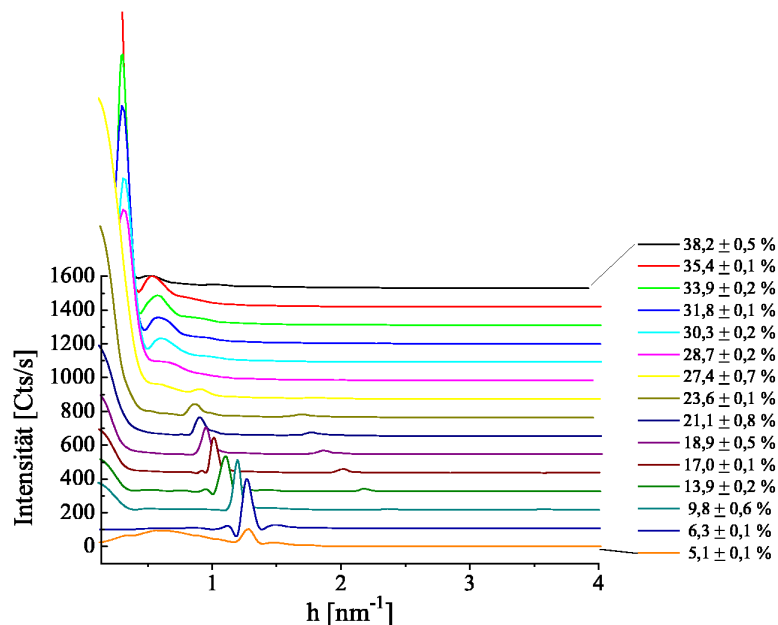


Abbildung 5.13: Entschmierte SAXD-Beugungsbilder der ternären Systeme mit 2% TM bei verschiedenen Wassergehalten [%].

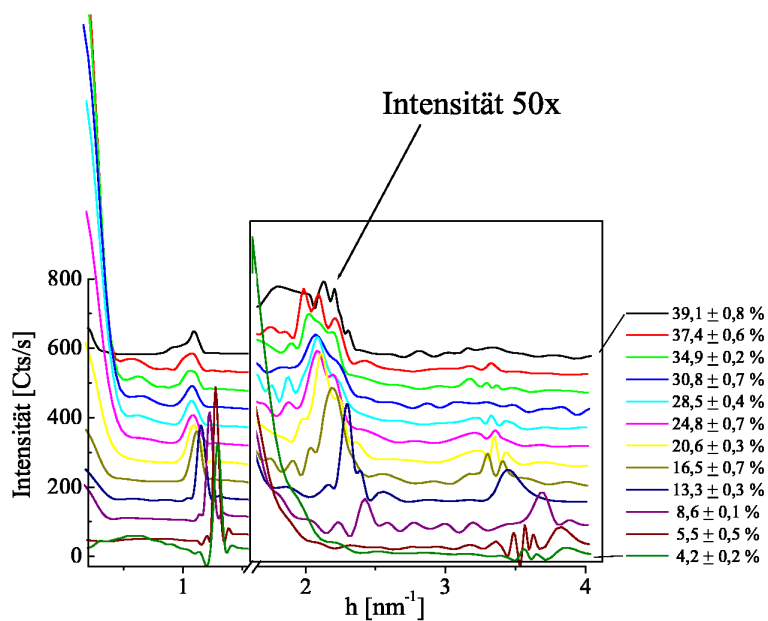


Abbildung 5.14: Entschmierte SAXD-Beugungsbilder der ternären Systeme mit 2% PHCl bei verschiedenen Wassergehalten [%]. Zur besseren Darstellung der Interferenzen höherer Ordnung wurden die Intensitäten für  $h > 1.6 \text{ nm}^{-1}$  um den Faktor 50 vergrößert.

das einer Schichtdicke von  $d = 22.5$  nm zuzuordnen ist. In Wiederholungsmessreihen konnte dieses Maximum bei den arzneistofffreien und den TM-haltigen Systemen bei Erreichen der Phasenlage VI, also bei Wasseranteilen von  $c_{aq} > 25\%$  als Interferenz 1. Ordnung beobachtet werden. Es ist nicht abschließend zu klären, ob dieses Maximum eine Interferenz darstellt, da sich in den unentschmierten Primärdaten kein Hinweis auf die Existenz dieser 1. Interferenz finden lässt. Außerdem befindet sich das diskutierte Maximum sehr nah an der Auflösungsgrenze der Kamera, so dass es von einem diffusen Hintergrund nur schwer zu unterscheiden ist. Aus diesen Gründen wurde die Interferenz für die Auswertung der Netzebenenabstände nicht berücksichtigt. Für die Annahme dieses Maximums als 1. Interferenz spricht jedoch, dass sich in diesem Fall die weiteren detektierten Interferenzen in die von Luzzati angegebene Reflexfolge für lamellare Strukturen (Tab. 2.1) einfügen, die bisherige 1. Interferenz also zum Maximum 2. Ordnung passt. Schlussfolgern lässt sich:

- Es ist unklar, ob es sich bei diesem 1. Maximum wirklich um eine Struktur oder um ein Artefakt aus der ITR-Auswertung handelt.
- Sollte eine Struktur mit der Schichtdicke  $d = 22.5$  nm in den Systemen existieren, so spricht vieles für ein Cremesystem. Beugungsmaxima, die Netzebenenabständen in dieser Größenordnung entsprechen, wurden bei Alberg für Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB gefunden und dahingehend interpretiert, dass es sich um maximal hydratisierte Mischkristallisate der eingesetzten Emulgatoren Na-Cetylstearylsulfat und Cetylstearylalkohol handelt [180], die die Creme als gerüstbildendes Netzwerk durchziehen. Lecithinmoleküle haben zwar eine andere Struktur als diese Emulgatoren, sind aber in ihrer Dimension vergleichbar. Deshalb könnte die Existenz eines ähnlichen gerüstbildenden Netzwerks auch in den hier untersuchten Systemen angenommen werden. Hinweise auf eine solche Creme-Struktur lieferte bereits die Polarisationsmikroskopie.
- Dass es sich eventuell um eine von den lamellaren Flüssigkristallen verschiedene Struktur handelt, ist in den Beugungsbildern der PHCl-haltigen Systeme angedeutet (Abb. 5.14). Hier treten bei hohen Wassergehalten von  $c_{aq} > 25\%$  die Strukturen der lamellaren Flüssigkristalle gleichzeitig mit den hier diskutierten Strukturen auf, die sich in den Beugungskurven durch ein schwaches, unscharfes Maximum bei  $h \approx 0.6 \text{ nm}^{-1}$  zeigen.

Eine genaue Strukturaufklärung dieser Systeme erfordert umfangreiche Studien mit besser auflösenden Röntgenkameras. Im Rahmen dieser Arbeit kann kein abschließendes Urteil über diese Struktur gefällt werden.



Die Netzebenenabstände  $d$  wurden aus den Streuvektoren  $h$  der Interferenzen  $n$ . Ordnung über die modifizierte Bragg'sche Beziehung berechnet:

$$d = \frac{2\pi n}{h} \quad ; \quad h = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \vartheta \quad (5.1)$$

Abb. 5.15 vergleicht die Schichtdicken der Multilayer der untersuchten Systeme.

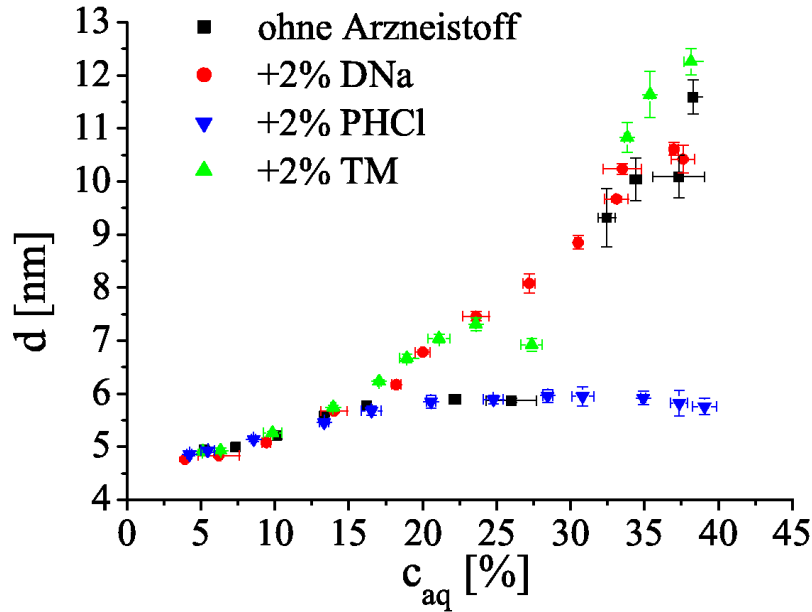


Abbildung 5.15: Netzebenenabstände  $d$  der in den untersuchten Systemen enthaltenen Multilayer.

Ein Anwachsen der lamellaren Schichtdicke von Phospholipid-Multilayern von ursprünglich etwa 4 nm auf über 6 nm bei kompletter Hydratation wurde vielfach in der Literatur beschrieben [176, 181]. Durch die Anwesenheit von IPM ändert sich die Schichtdicke der Systeme mit geringem Wassergehalt auf etwa  $d = 5$  nm [15, 103].

Der Grafik 5.15 ist zu entnehmen, dass für die **arzneistofffreien Systeme** der Netzebenenabstand von  $d = 5.0$  nm auf  $d = 6.1$  nm leicht ansteigt. Bei einem Wassergehalt von  $c_{aq} \approx 25\%$  steigt die lamellare Schichtdicke sprunghaft auf  $d = 9.5 \pm 0.5$  nm. Dieser Anstieg ist mit einem deutlichen Strukturverlust verbunden und markiert den Phasenübergang von der lamellaren Phasenlage II in die mehrphasige Phasenlage VI. Der Strukturverlust ist anhand der Unschärfe der Interferenzen (Abb. 5.11) und den damit verbundenen großen Fehlerbalken zu diagnostizieren. Mit weiter ansteigendem Wassergehalt findet ein weiterer Anstieg des Strukturabstands auf  $d = 11 - 12$  nm statt, der allerdings quantitativ nur schwer reproduzierbar ist. Diese großen Abstände

sind nur durch eine Umstrukturierung der Systeme zu erklären. Bei einem molaren Wasseranteil von  $w_0 \approx 35$  ist die Hydratation des polaren Kopfbereichs der Lecithinmoleküle abgeschlossen [182], weitere Wassermoleküle liegen dann als freies Wasser vor und können so eine Systemänderung induzieren. Diese Systemänderung in Form eines Phasenübergangs findet im arzneistofffreien Lecithin/IPM/Wasser-System bei einem Wassergehalt von  $c_{aq} \approx 25\%$  statt, was einem molaren Verhältnis von  $w_0 \approx 50$  entspricht. Nach der kompletten Hydratation des Lecithins scheint sich das freie Wasser zunächst zwischen die polaren Kopfgruppen in die Multilayer zu lagern. Liegt sehr viel freies Wasser vor, so bildet das Wasser eine eigene Phase. Es kommt dann zu dem von Hamann beschriebenen Mehrphasensystem der Phasenlage VI [18]. Ein ähnlicher Phasenübergang wurde auch von Avramiotis et al. beschrieben, die in Anwesenheit des Kotensids Propanol einen Übergang von einer Mikroemulsion in ein bikontinuierliches System bei  $w_0 > 30$  fanden [182]. Die Struktur der Phasenlage VI konnte – wie oben beschrieben – nicht endgültig aufgeklärt werden. Sollte sich das ausgewertete Maximum bei hohen Wassergehalten als das Maximum 2. Ordnung herausstellen, dann wären die Abstände  $d$  doppelt so groß wie in Abb. 5.15 angegeben. Das betrifft die arzneistofffreien und die mit 2% TM beladenen Systeme bei hohen Wassergehalten.

Die Systeme mit **2% Timolol-Hydrogenmaleat** zeigen das aufgrund der bisherigen Resultate erwartete Bild. Ein kontinuierliches Anwachsen der Netzebenenabstände bis etwa  $c_{aq} = 22\%$  ist zu beobachten. Im Bereich  $c_{aq} = 27 - 35\%$  verschwindet die lamellare Struktur, um dann bei sehr hohen Wassergehalten wieder ansatzweise sichtbar zu sein. Hier sind sehr unscharfe Interferenzen bei Schichtdicken von  $d = 11.5 - 12.5$  nm zu beobachten, wobei auch hier wieder die Problematik auftritt, dass die ausgewertete Interferenz nicht eindeutig dem Maximum 1. Ordnung zuzuordnen ist. Kurz vor dem Phasenübergang in das unstrukturierte System nimmt die Schichtdicke leicht ab. In Konzentrationen von 4% TM ist kein Phasenübergang mehr feststellbar; die Schichtdicke nimmt kontinuierlich zu (s. Abb. 5.7). TM ist im wässrigen Medium über elektrostatische Wechselwirkungen an das Lecithin gebunden [183]. Das Salz liegt dann dissoziiert vor, das Timolol-Kation ist voraussichtlich an die negativ geladene Phosphatgruppe des Lecithins, das Maleat-Anion an die positive TMA-Gruppe gebunden. Da in den Systemen relativ viel Wasser vorhanden ist, ist eine solche Bindung zwischen TM und Lecithin wahrscheinlich. Durch diese Bindung kann nicht mehr soviel Wasser an die Phosphatgruppe angelagert werden. Dies sorgt für eine stärkere Aufquellung der Lamellen bis zu  $d = 7.5$  nm bei  $c_{aq} = 22.5\%$  Wasser. Bei höheren Wassergehalten zerbricht diese Struktur und es tritt ein mehrphasiges W/O-System auf, was durch einen Anfärbetest mit Sudanrot nachgewiesen werden konnte. Die zwischenzeitliche Abnahme des Netzebenenabstands bei  $c_{aq} = 27.5\%$  konnte in dieser Form nicht reproduziert werden. Es handelt sich hier entweder um einen Ausreißer oder um eine nur unter bestimmten kritischen Bedingungen

auf tretende Übergangsstruktur.

Eine sehr ähnliches Verhalten zeigen die lamellaren Flüssigkristalle in Gegenwart von **2% Diclofenac-Na**. Allerdings bleibt hier der Phasenübergang aus, die Schichtdicke der Lamellen nimmt mit zunehmendem Wassergehalt kontinuierlich zu. Ein solcher Effekt wurde von Rydhag bei der Wechselwirkung zwischen Lecithin und Na-stearat beobachtet [176]. Diclofenac-Na weist also, ähnlich wie Na-stearat einen Kotensid-Effekt auf, der für ein „ideales Quellungsverhalten“ sorgt [176]. Unterstützt werden diese Thesen durch den Kurvenverlauf der Schichtdicken binärer Systeme aus emulgierendem Cetylstearylalkohol und Wasser, der dem Verlauf der DNa-Systeme aus Abb. 5.15 sehr ähnelt [184]. TM scheint einen ähnlichen Effekt zu bewirken, ist aber in Konzentrationen von 2% in einem zu geringen molaren Verhältnis zum Lecithin, so dass es bei  $c_{aq} = 25\%$  zum Strukturzusammenbruch nebst Phasenübergang kommt.

In Gegenwart von **2% Pilocarpin-HCl** wächst die Schichtdicke der Lamellen mit zunehmendem Wassergehalt wie bei den arzneistofffreien Systemen zunächst leicht an. Bei weiterer Wasserzugabe bleibt sie dann ohne weiteren Phasenübergang bei  $d = 6.0$  nm konstant. Der stabilisierende Effekt des PHCl ist durch einen Einbau in die polaren Kopfbereiche der Multilayer mit nachfolgender lateraler Aufweitung zu erklären. Durch diese Aufweitung können wesentlich mehr Wassermoleküle zwischen die Kopfgruppen der Phospholipidmoleküle eingebaut werden, ohne dabei die Schichtdicke der Multilayer zu verändern oder gar für einen Strukturzusammenbruch zu sorgen.

Der Phasenübergang der lamellaren Phase in die invers mizellare Lösung erfolgt über ein langsames Auflösen der lamellaren Strukturen, was am Ausbleiben der Interferenzen höherer Ordnung zu erkennen ist. Die Zugabe des Arzneistoffs hat Einfluss auf den Wassergehalt, bei dem dieser Phasenübergang stattfindet. Da der Phasenübergang sehr stark temperaturabhängig ist [185], konnten aufgrund der simultanen Messung bei einer Temperatur von  $50^\circ\text{C}$  (Kap. 3.2) keine scharfen Grenzen ermittelt werden. Stattdessen wird der Bereich angegeben, in dem im Mittel die mit SAXD detektierbaren Strukturen verschwinden (Tab. 5.3).

Durch 2% PHCl wird der Phasenübergang nicht signifikant beeinflusst. In Anwesenheit von TM ist mehr Wasser in der IML solubilisierbar, während bei 2% DNa der Phasenübergang bei niedrigeren Wassergehalten auftritt. Aus den rheologischen Untersuchungen von Papantoniou konnten ähnliche Resultate erhalten werden [107]. Demnach beeinflusst PHCl in geringen Konzentrationen das Viskositätsmaximum nicht, DNa verschiebt es zu deutlich kleineren Wasserkonzentrationen und Diclofenac-Säure erlaubt die Solubiliati-on deutlich größerer Mengen an Wasser. Eine von Papantoniou durchgeführte Studie der

Tabelle 5.3: Maximal in eine arzneistoffbeladene Standard-IML solubilisierbare Wasserkonzentration  $c_{aq}$  vor dem Phasenübergang in eine Lamellarphase.

| Arzneistoff      | $c_{AS}[\%]$ | $c_{aq}[\%]$ |
|------------------|--------------|--------------|
| ohne Arzneistoff | –            | 3.5-3.7%     |
| TM               | 2%           | 4.6-4.8%     |
| TM               | 4%           | 4.8-5.0%     |
| DNa              | 2%           | 2.9-3.3%     |
| PHCl             | 2%           | 3.5-3.9%     |

Wasseraufnahmekapazität inverser Mizellen zeigt für PHCl deutlich verminderte Werte, was darauf hindeutet, dass in den mit PHCl beladenen Mizellen von Papantoniou noch Restwasser vorhanden sein musste [107]. Der Grund für die Differenz in der Solubilisationskapazität ist wahrscheinlich im durch den Arzneistoff veränderten Packungsparameter zu suchen. Eine umfangreichere Diskussion findet im Anschluss an die Ergebnisse aus den Messungen der invers mizellaren Lösung in Kapitel 6 statt.

### 5.2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich die Strukturen der Systeme visualisieren. Dargestellt werden folgende Systeme (Abb. 5.16):

- (a) ohne Arzneistoff,  $c_{aq} = 7.5\%$
- (b) ohne Arzneistoff,  $c_{aq} = 40\%$
- (c) mit 2% TM,  $c_{aq} = 7.5\%$
- (d) mit 2% TM,  $c_{aq} = 24\%$

Die Systeme mit geringem Wassergehalt, (a) und (c), zeigen ausgedehnte Bereiche lamellarer Flüssigkristalle. Ein Strukturunterschied zwischen dem arzneistofffreien System (a) und dem beladenen System (c) ist – wie den Netzebenenabständen nach zu vermuten – nicht zu erkennen (Abb. 5.15). Die unbeladenen Systeme mit  $c_{aq} = 40\%$  zeigen nur selten Bereiche lamellarer Struktur. Dort, wo solche Bereiche auftreten (b), handelt es sich um wulstartige, relativ ungeordnete Strukturen. Eine abgeschätzte Dicke der Multilayer von ca. 1.5 nm auf dem Bild entspräche einem lamellaren Abstand von  $d \approx 23$  nm. Ist die Abschätzung der Schichtdicke aus dem TEM-Bild korrekt, spräche dies für die Existenz des nur teilweise detektierten 1. Maximums bei den Röntgenbeugungsuntersuchungen dieser Systeme und somit für ein cremeähnliches System. Ein deutlicher Strukturverlust bei leichter Zunahme der Schichtdicke ist bei (d) zu erkennen. Das System mit 2% TM befindet sich hier noch vor dem Phasenübergang in ein mehrphasiges System. Die bisherigen Resultate können somit durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen

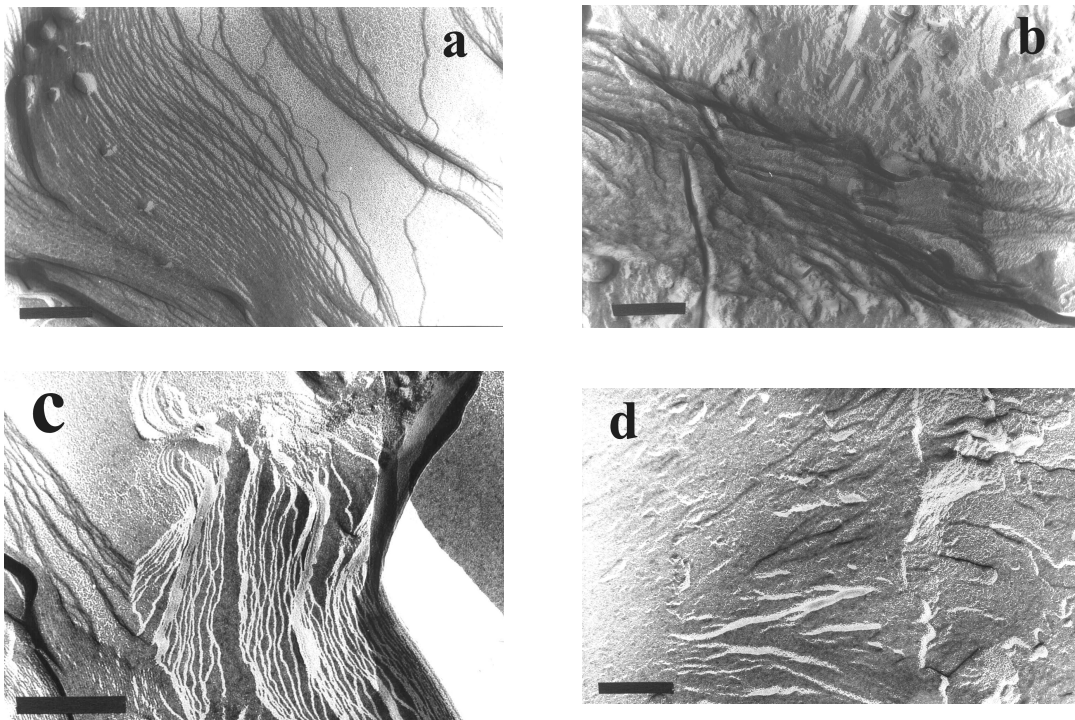


Abbildung 5.16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der ternären Systeme Lecithin/IPM/Wasser. Arzneistofffreie Systeme mit 7.5% (a) und 40% Wasser (b). Systeme mit 2% TM und 7.5% (c) bzw. 24% Wasser (d). Bilder (a),(c),(d) Balken: 240 nm; Bild (b) Balken: 300 nm.

bestätigt werden.

### 5.3 Untersuchung der invers mizellaren Systeme

Bei geringeren als den in Tabelle 5.3 angegebenen Wassergehalten befindet sich das System im Zustand einer invers mizellaren Lösung. Die physiko-chemischen Eigenschaften dieser IML sind jedoch nicht gleichbleibend, sondern hängen stark vom Wassergehalt der Systeme ab. Allein vom makroskopischen Erscheinungsbild lässt sich die invers mizellare Phase in drei Unterbereiche aufteilen:

1. Bei Wassergehalten knapp unterhalb des Phasenübergangs (Tab. 5.3) wird das klare System bei Abkühlung etwas trübe. Strukturen sind weder in der Polarisationsmikroskopie noch in der Röntgenbeugung zu erkennen. Die Zähigkeit dieser Systeme erscheint relativ hoch. Über die Struktur dieses Systems liegen diverse Interpretationen vor, die am Ende von Kap. 2.2.5 erläutert sind. Am wahrscheinlichsten erscheint dabei die Interpretation von Shchipunov, der von einer Verzweigung der

Spaghettimizellen ausgeht [94].

2. Einhergehend mit einem abnehmenden Wasseranteil nimmt die Zähigkeit noch etwas zu. Das System ist gelartig und klar. In diesem Bereich liegt ein System verknäuelter Spaghettimizellen vor, bei dem es sich rheologisch nach Müller um ein Sol handelt [3].
3. Ist die Konzentration des Wassers kleiner als  $c_{aq} \approx 1.5\%$ , so nimmt die Zähigkeit wiederum rapide ab. Die Spaghettimizellen transformieren zu kleineren, stabförmigen Aggregaten.

Dieses auch in der Literatur häufig beschriebene Verhalten [88, 92–94] kann qualitativ unabhängig von der Arzneistoffbeladung beobachtet werden. Der Arzneistoff hat jedoch über seine Wechselwirkungen mit den Phospholipiden einen starken Einfluss auf die quantitative Veränderung der Systeme. Diese Veränderungen werden anhand der Mizellgröße und -form in den folgenden Abschnitten untersucht. Die Resultate werden unter Berücksichtigung von bereits aus anderen Studien vorliegenden rheologischen Messergebnissen diskutiert. Um Wechselwirkungen zwischen den Mizellen zu vermeiden, wurden die Systeme vor der individuellen Charakterisierung der Mizellen 1:15 mit IPM verdünnt.

### 5.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Mit der Photonenkorrelationsspektroskopie wurde der hydrodynamische Durchmesser  $d$  der inversen Mizellen ermittelt. Dieser Parameter ist ein Richtwert für die Größe der Mizellen. Da von einem eindimensionalen Wachstum zu Spaghettimizellen ausgegangen wird, unterscheiden sich die Assoziate vor allem in ihrer Länge. Ein größerer hydrodynamischer Durchmesser weist somit auf längere Mizellen hin. Wegen des durch Wasser induzierten Wachstums zu Spaghettimizellen wird erwartet, dass mit zunehmendem Wassergehalt auch der hydrodynamische Durchmesser deutlich zunimmt. In Abb. 5.17 sind die aus der PCS erhaltenen Mizellgrößen in Abhängigkeit des Wassergehalts und des Gehalts an Timolol-Hydrogenmaleat angegeben. Die Messpunkte resultieren aus jeweils  $n = 2 - 3$  Messreihen. Aus der Tatsache, dass sich ein gleichmäßiger Kurvenverlauf ergibt, ist abzuleiten, dass die mit diesem Verfahren erhaltenen Messwerte reproduzierbar sind. Alle Systeme wurden mit Phospholipon<sup>R</sup>90 G der Ch.-Nr. 90050 hergestellt.

Eine deutliche Zunahme der Mizellgröße mit ansteigendem Wassergehalt ist für alle Systeme zu beobachten. Da das Größenwachstum nichtlinear ist und der hydrodynamische Durchmesser bei zunehmender Anisometrie der Partikel überproportional zunimmt, ist auf eine anisometrische Größenzunahme zu schließen. Für isotrope, sphärische AOT-Mizellen wurde dagegen ein lineares Anwachsen des hydrodynamischen

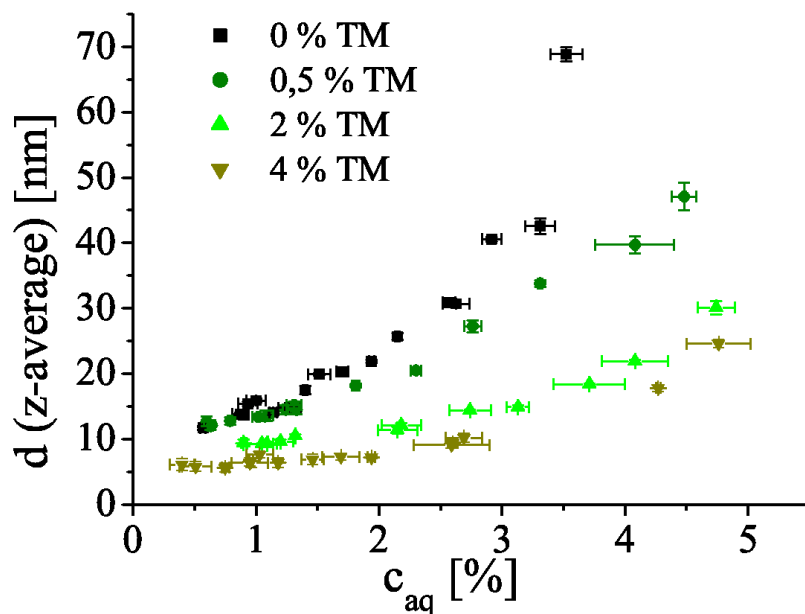


Abbildung 5.17: Der aus der PCS resultierende hydrodynamische Durchmesser  $d$  für Standard-IML mit verschiedenen Wassergehalten und verschiedenen Anteilen von TM.

Durchmessers mit dem Wassergehalt beobachtet [58]. Des weiteren ist auffällig, dass mit zunehmendem Gehalt an Timolol-Hydrogenmaleat die Mizellen bei gleichem Wassergehalt kleiner werden und die Größenzunahme mit steigendem Wassergehalt geringer ausfällt. Zusammen mit der von Müller beobachteten deutlich verringerten Viskosität timololhaltiger Standard-IML [3] sind diese Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass TM das Wachstum inverser lecithinhaltiger Mizellen zu Spaghettimizellen behindert. Die Mizellen mit 4% TM und geringem Wassergehalt weisen mit  $d = 5 - 6$  nm eine äußerst niedrige Größe auf. Aus Molecular Modelling-Berechnungen konnte für das gestreckte Lecithin-Molekül eine Länge von insgesamt 3 nm ermittelt werden, so dass bei diesen Mizellen vom geringstmöglichen Durchmesser und damit von isotropen Assoziaten ausgegangen werden muss.

Als weiterer interessanter Effekt ist eine Änderung der maximal solubilisierbaren Wasserkonzentration zu beobachten. Während dieser Wert für die unbeladene IML bei  $c_{aq} = 3.7\%$  liegt, verschiebt sich dieser Wert schon bei Solubilisierung von 0.5% TM auf  $c_{aq} = 4.4\%$ , um dann bei weiterer Solubilisierung von insgesamt 4% TM auf etwa  $c_{aq} = 4.8\%$  anzuwachsen. Allein die Anwesenheit von geringen Mengen an Timololmaleat (0.5% entsprechen einem molaren TM/Lecithin-Verhältnis von 0.03) kann die Solubilisierungskapazität der IML für Wasser merklich erhöhen.

Die den obigen Resultaten entsprechenden Proben wurden mit Phospholipon<sup>R</sup>90 G der Charge Nr. 90050 hergestellt. Für weitere Untersuchungen stand diese Charge nicht mehr zur Verfügung, es musste auf Charge Nr. 90080 gewechselt werden. Die Kurvenverläufe konnten mit der neuen Charge nur noch qualitativ, nicht jedoch quantitativ reproduziert werden. Die aus Ch.-Nr. 90080 hergestellten inversen Mizellen sind durchgängig etwas größer als die Mizellen aus Lecithin der Ch.-Nr. 90050. Als Ursache für die schlechte Reproduzierbarkeit ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Chargen zu sehen (Tab. 3.2). Da sich die Mizellen in einem thermodynamischen Gleichgewicht befinden, kann eine etwas andere Zusammensetzung der Charge dieses Gleichgewicht zu größeren oder kleineren Partikeln hin verschieben. Bei langen, zylindrischen Mizellen fällt besonders ins Gewicht, dass die Ausbildung der abgerundeten Enden der Mizellen, der sog. *end caps*, sehr stark von Fremdmolekülen beeinflusst wird. Das Ausmaß des Zylinderwachstums ist nämlich durch das Verhältnis der freien Energie zur Bildung dieser *end caps* zu der für ein fortgesetztes Zylinderwachstum nötigen freien Energie gegeben [81, 87] und kann so durch den Einbau von Fremdmolekülen stark beeinflusst werden. Als Konsequenz aus der Chargenabhängigkeit der PCS-Resultate werden diese nur qualitativ betrachtet.

In diesem Kontext werden auch die Resultate zur Messung des Arzneistoffeinflusses auf die Mizellgröße gesehen. Ein Vergleich zwischen der arzneistofffreien IML und den mit den Arzneistoffen TM, DN<sub>a</sub> und PHCl in Konzentrationen von 2% beladenen IML zeigt folgenden Einfluss der Solubilisation auf die Mizellgröße (Abb. 5.18):

- Der oben diskutierte überproportionale Zuwachs der **arzneistofffreien Mizellen** mit zunehmendem Wassergehalt kann auch mit dieser Messreihe bestätigt werden. Die arzneistoffhaltigen Systeme zeigen allesamt ein ähnliches Größenwachstum.
- **Timolol-Hydrogenmaleat** wirkt der Assoziation zu Spaghettimizellen entgegen. Die Assoziate mit solubilisiertem TM sind kleiner als die arzneistofffreien. Ihre Größe nimmt mit zunehmendem Wasseranteil weniger stark zu.
- **Diclofenac-Na** scheint in dieser Konzentration den Mizellisationsprozess nur schwach zu beeinflussen. Eine leichte Vergrößerung der Mizellen durch das DN<sub>a</sub> ist in Abb. 5.18 angedeutet.
- **Pilocarpin-HCl** verstärkt die Assoziation zu Spaghettimizellen, jedoch nicht in dem Ausmaß, wie in den Studien von Papantoniou angegeben [107]. Obwohl bei Papantoniou der Restwassergehalt nicht ermittelt wurde, ist davon auszugehen, dass die im Rahmen seiner Arbeit hergestellten Systeme höhere  $c_{aq}$  aufweisen als die in



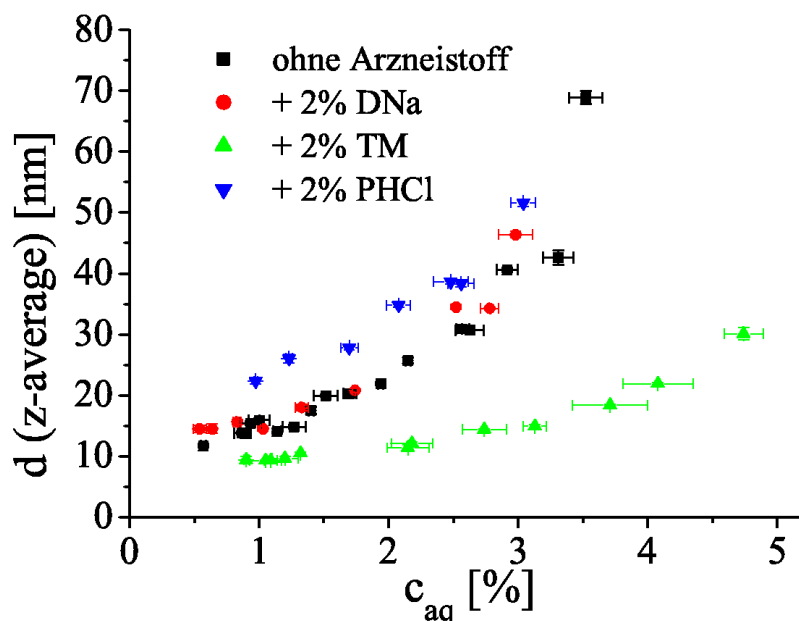


Abbildung 5.18: Der hydrodynamische Durchmesser – als z-average aus der PCS – für verschiedene arzneistoffbeladene Standard-IML.

dieser Arbeit untersuchten. Untermauert wird diese These durch die von Papantoniou beschriebene Herstellungsweise der PHCl-haltigen IML, in denen das Wasser nach Zugabe einer wässrigen PHCl-Lösung und nachfolgender Transformation zum lamellaren Flüssigkristall bis zum Klarpunkt evaporisiert wurde [107]. An diesem Punkt können jedoch noch über 2% Wasser in den Proben, die Papantoniou als wasserfrei annimmt, enthalten sein. Mit diesem Restwassergehalt lässt sich außerdem die oben angesprochene geringere Solubilisationskapazität von Wasser erklären.

### 5.3.2 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Mit der Röntgenkleinwinkelstreuung lassen sich Größe und Form der inversen Mizellen ermitteln. Der Form der Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  konnte entnommen werden, dass es sich bei den Streuobjekten um zylindrische Aggregate handelt. In Kapitel 4.3 ist am Beispiel einer verdünnten Standard-IML die Interpretation dieser Elektronenabstandsfunktion ausführlich beschrieben. Im folgenden Abschnitt werden die Streukurven und Elektronenabstandsfunktionen diskutiert. Danach wird eine spezielle Analyse des Zylinderquerschnitts der Partikel behandelt. Untersucht wurden die Systeme mit 2%iger Arzneistoffbeladung. Die Streukurven und die aus ihnen mit dem Programm ITP-92 ermittelten Elektronenabstandsfunktionen sind in den Abbildungen 5.19–5.25 zu sehen.

Für die SAXS-Untersuchungen wurde ausschließlich Phospholipon<sup>R</sup>90 G der Ch.-Nr. 90080 eingesetzt.

### Systeme ohne Arzneistoff

Die Elektronenabstandsfunktionen weisen allesamt eine ausgeprägte Asymmetrie auf. Nach einem deutlichen Maximum bei kleinen Abständen  $r$  findet eine nur geringe Abnahme zu großen  $r$  statt. Der letztere Teil der  $p(r)$ -Funktion wird wegen seines Kurvenverlaufs im folgenden als *Auslaufbereich* bezeichnet. Aus dem asymmetrischen Kurvenverlauf ist abzuleiten, dass die Mizellen eine starke Anisometrie aufweisen. Man muss dabei aber berücksichtigen, dass es sich um polydisperse invers mizellare Systeme handelt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein geringer Anteil sphäroider Mizellen in der IML vorliegt. Aus der Form der Elektronenabstandsverteilungen lässt sich durch den Vergleich zu Modellsystemen [166] schließen:

1. Da sich das Maximum der  $p(r)$ -Funktion in seiner Position nur leicht verschiebt, ist davon auszugehen, dass der Querschnitt der Zylinder sich ebenfalls nur wenig ändert. Der Zylinderquerschnitt wird in Abschnitt 5.3.3 gesondert behandelt.
2. Durch den Schnittpunkt des Auslaufbereichs mit der Abszisse lässt sich die Maximalausdehnung der Zylinder bestimmen [162, 166]. Der Auslaufbereich ist jedoch nicht linear, was einerseits darauf hinweist, dass es sich um eine Verteilung von Zylindern verschiedener Längen handelt. Andererseits wird die Form der Elektronenabstandsfunktion zu hohen  $r$  durch die Wahl der Abbruchbedingung beeinflusst [139], falls diese – wie in diesem Fall durch die Auflösungsgrenze der Kratky-Kamera notwendig – bei Werten für  $r$  kleiner als die Partikelgröße gesetzt werden muss. In diesen Fällen wird der Abbruch künstlich erzeugt und der Abszissenschnittpunkt gibt nicht die Partikelgröße an. Theoretisch lässt sich die Länge der Mizellen dann durch eine Extrapolation des Auslaufbereichs auf die Abszisse abschätzen. Durch die Abbruchbedingung  $p(r) = 0$  für  $r > 16$  nm ist dieses jedoch erschwert, da diese Bedingung die Kurven im Bereich großer  $r$  verfälscht [139]. Da für verschiedene als Abbruchbedingungen angenommene Maximalgrößen  $D_{max}$  deutlich unterschiedliche Längen ermittelt werden konnten und die Systeme dazu polydispers sind, wird auf eine Angabe der mittleren Länge verzichtet.
3. Falls die Elektronenabstandsfunktion im Auslaufbereich höhere Werte annimmt, wird – qualitativ betrachtet – von im Mittel längeren Mizellen ausgegangen. Dies ist für alle untersuchten Modellsysteme bei steigendem Wassergehalt festzustellen (Abb. 5.20– 5.26). Ein Längenwachstum zu Spaghettimizellen konnte somit durch die SAXS-Resultate eindeutig belegt werden.

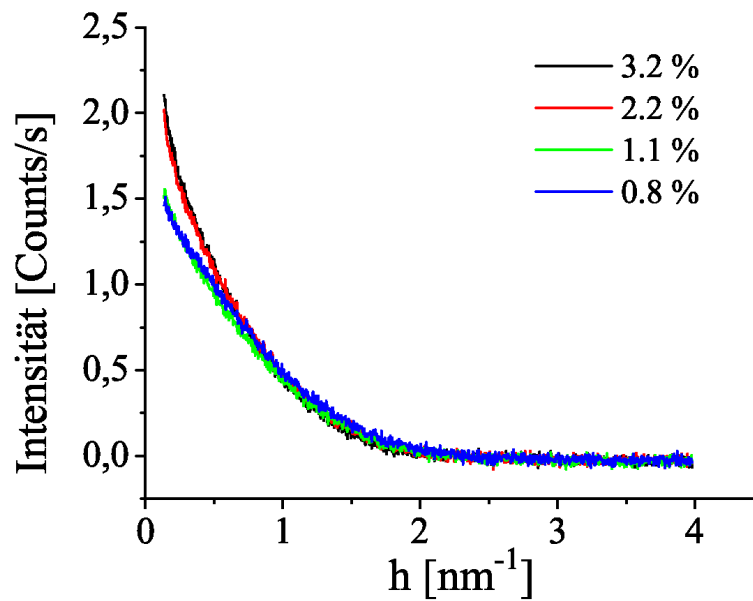


Abbildung 5.19: SAXS-Streukurven (verschmiert) der verdünnten Standard-IML ohne Arzneistoffbeladung mit den angegebenen Wasseranteilen [%]. Die Streuung des Lösungsmittels IPM wurde bereits von den Streukurven subtrahiert.

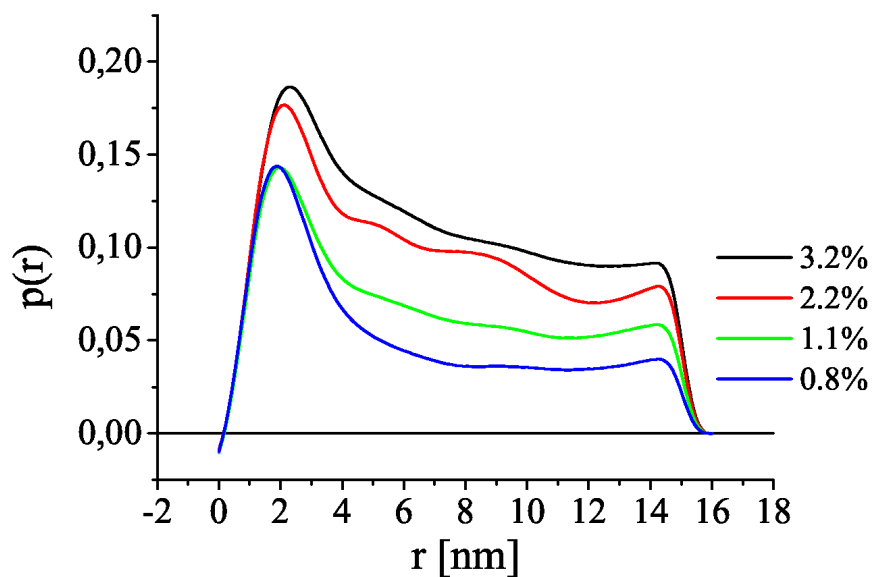


Abbildung 5.20: Elektronenabstandsfunctionen  $p(r)$  der verdünnten Standard-IML mit angegebenem Wasseranteil [%] ohne Arzneistoff, berechnet nach postulierter Kugelsymmetrie.

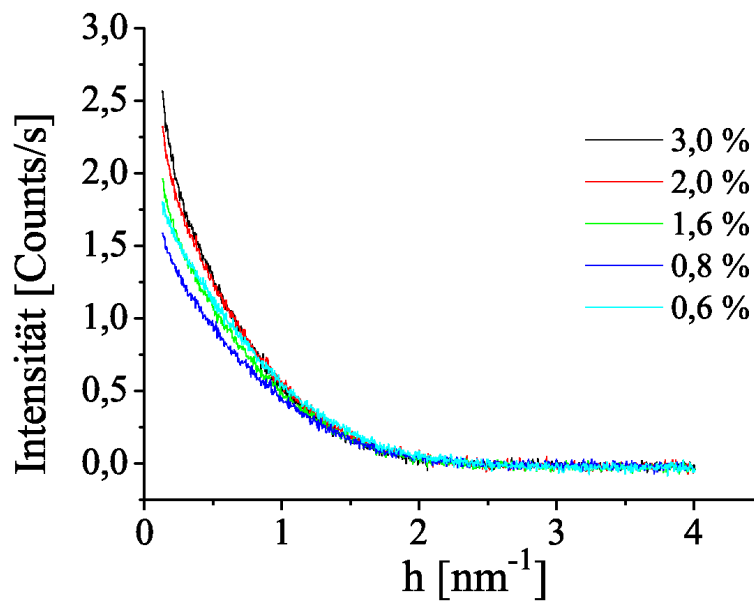


Abbildung 5.21: SAXS-Streukurven (verschmiert) der verdünnten Standard-IML mit 2% Diclofenac-Na und dem angegebenen Wasseranteilen [%]. Die Streuung des IPM wurde bereits korrigiert.

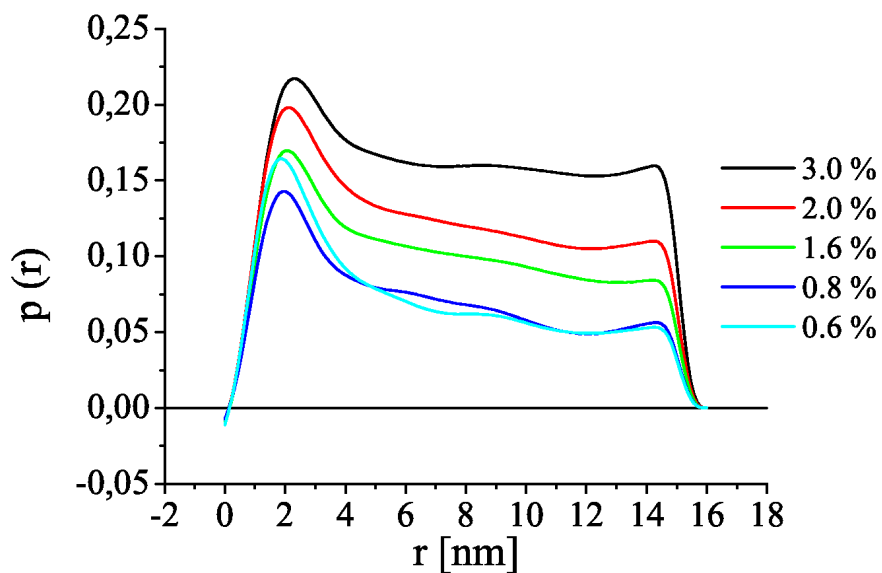


Abbildung 5.22: Elektronenabstandsfunctionen  $p(r)$  der verdünnten Standard-IML mit 2% Diclofenac-Na und den angegebenen Wasseranteilen [%], berechnet nach postulierter Kugelsymmetrie.

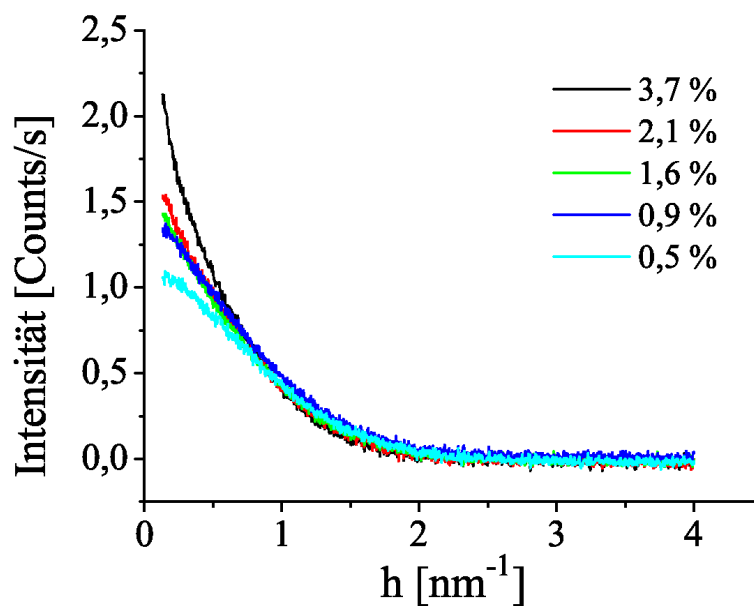


Abbildung 5.23: SAXS-Streukurven (verschmiert) der verdünnten Standard-IML mit 2% Timolol-Hydrogenmaleat und den angegebenen Wasseranteilen [%]. Die Streuung des IPM wurde bereits korrigiert.

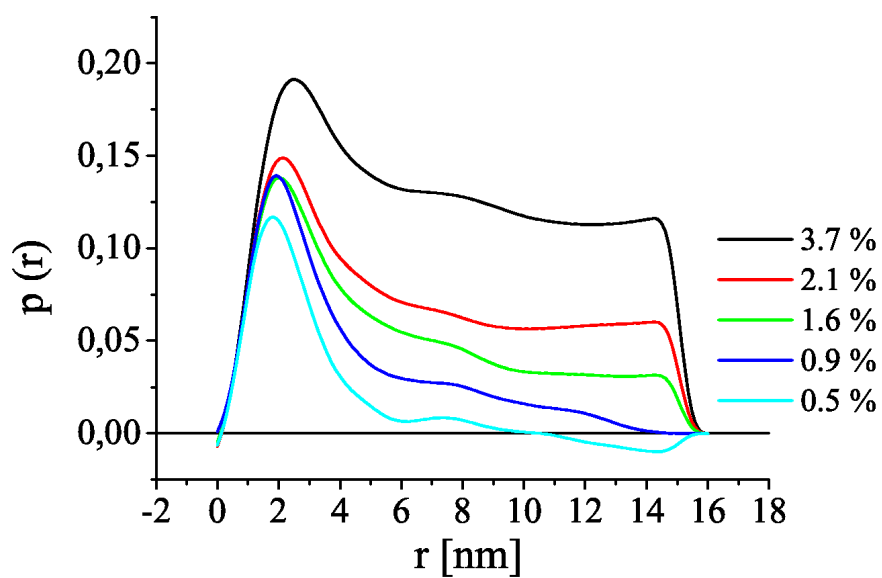


Abbildung 5.24: Elektronenabstandsfunktionen  $p(r)$  der verdünnten Standard-IML mit 2% Timolol-Hydrogenmaleat und den angegebenen Wasseranteilen [%], berechnet nach postulierter Kugelsymmetrie.

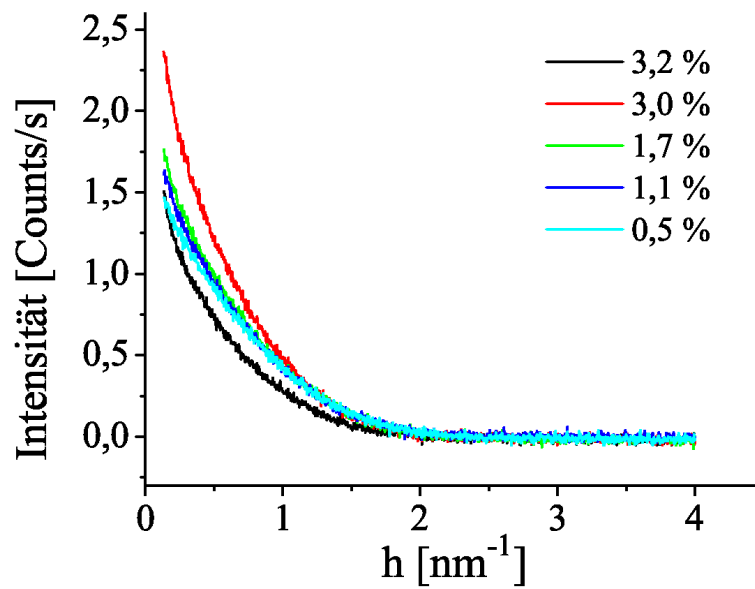


Abbildung 5.25: SAXS-Streukurven (verschmiert) der verdünnten Standard-IML mit 2% Pilocarpin-HCl und den angegebenen Wasseranteilen [%]. Die Streuung des IPM wurde bereits korrigiert.

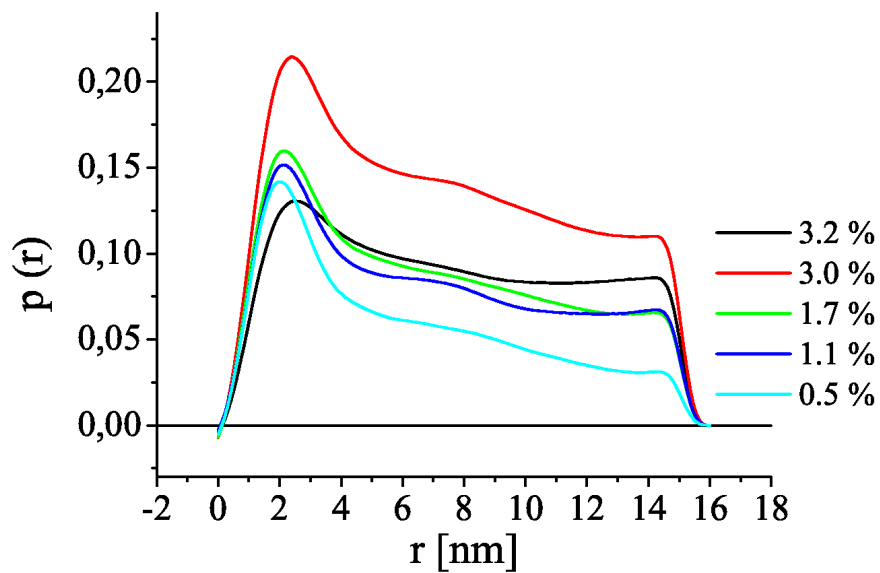


Abbildung 5.26: Elektronenabstandsfunctionen  $p(r)$  der verdünnten Standard-IML mit 2% Pilocarpin-HCl und den angegebenen Wasseranteilen [%], berechnet nach postulierter Kugelsymmetrie.

### Systeme mit 2% Timolol-Hydrogenmaleat

Timolol-Hydrogenmaleat hat in dieser Konzentration einen merklichen Einfluss auf die Länge der Mizellen. Für die Systeme mit  $c_{aq} = 0.5\%$  kann durch den Schnittpunkt der  $p(r)$ -Funktion mit der Abszisse eine Länge von  $r = 8 \pm 2$  nm ermittelt werden, die Mizellen mit  $c_{aq} = 0.9\%$  Wasser weisen eine mittlere Länge von  $r = 14 \pm 1$  nm auf. Die Längenangaben beziehen sich auf den polaren Kern der Mizellen, da nur dieser überhaupt gemessen werden kann. Es handelt sich im Mittel um sehr kurze Stäbchen, was im Vergleich zu den längeren arzneistofffreien Mizellen darauf schließen lässt, dass TM eine Verkürzung der Mizellen bewirkt.

Die in Abb. 5.24 bei sehr hohem Wassergehalt von  $c_{aq} = 3.7\%$  deutlich ausgeprägte Anisometrie der TM-haltigen Systeme steht nicht im Einklang mit den PCS-Resultaten sowie den Viskositätsmessungen von Müller [3]. Die PCS-Resultate zeigen, dass selbst bei hohen Wassergehalten die mittlere Mizellgröße in Anwesenheit von TM deutlich geringer ist als die der arzneistofffreien Systeme (Abb. 5.18). Müller fand, dass der starke Viskositätsanstieg arzneistofffreier Systeme mit steigendem Wassergehalt, der aus dem Wachstum zu Spaghettimizellen resultiert, bei Zusatz von TM nahezu ausbleibt. Eine Auflösung dieses Dilemmas besteht darin, dass die inversen Spaghettimizellen als dynamische Systeme betrachtet werden müssen, die auseinanderbrechen und rekombinieren können (*break and recombine*, [94]). Das Auseinanderbrechen der Assoziate wird durch mechanische Beanspruchung, wie sie bei der Viskositätsmessung stattfindet, gefördert, obwohl die Wechselwirkungen zwischen den durch H-Brücken zusammengehaltenen Lecithinmolekülen in den arzneistofffreien Mizellen vergleichsweise stark sind und ein Auseinanderbrechen der Assoziate erschweren. Daraus resultiert die hohe Viskosität der arzneistofffreien Systeme bei hohem Wassergehalt. Die Wechselwirkungen zwischen Lecithin und Timolol-Hydrogenmaleat sind offenbar schwächer, so dass das TM quasi als „Sollbruchstelle“ der Spaghettimizellen dient. Bei mechanischer Beanspruchung ist die Viskosität der Systeme in Anwesenheit von TM damit stark reduziert. In der Kratky-Kamera und dem Probenbehältnis im ZetaSizer fehlt diese mechanische Beanspruchung. Ein Auseinanderbrechen und Rekombinieren der Mizellen findet hier nur durch Diffusionsprozesse statt. In der PCS wird die Partikelgröße anhand der Diffusion ermittelt; hier erscheinen die TM-haltigen Spaghettimizellen durch das Auseinanderbrechen deutlich kleiner. In der Röntgenkleinwinkelstreuung wird die Elektronenstruktur der Systeme über einen Messzeitraum von  $t = 3600$  s gemittelt. Durch diese Mittelung können die in wesentlich kürzeren Zeiten ablaufenden *break and recombine*-Prozesse nicht mehr aufgelöst werden, weshalb hier keine Unterschiede zwischen den arzneistofffreien und den TM-haltigen Systemen bei hohem Wassergehalt festzustellen sind.

### Systeme mit 2% Diclofenac-Na bzw. 2% Pilocarpin-HCl

DNa und PHCl scheinen das Längenwachstum nicht merklich zu beeinflussen. Die Mizellen sind, wenn überhaupt, im Mittel geringfügig länger als die arzneistofffreien Assoziate, was aus dem etwas höher liegenden Auslaufbereich der  $p(r)$ -Funktionen geschlossen werden kann. Das von Papantoniou entdeckte verminderte Viskositätsmaximum der DNa-haltigen Systeme [107] kann – in geringerer Ausprägung – auf die gleichen Ursachen wie beim TM zurückzuführen sein.

Hervorzuheben sei noch, dass die arzneistofffreien Systeme selbst bei geringen Wasserzusätzen niemals sphäroid sind. Ob völlig wasserfreie Lecithin-Assoziate wie häufig in der Literatur behauptet [48, 81, 93, 186] eine Kugelform annehmen, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Einen eher unfreiwilligen Hinweis auf das Vorhandensein anisometrischer Mizellen auch bei geringen Wasseranteilen liefern Aliotta et al. [92]. Die Autoren setzten für die Auswertung einen Strukturfaktor sphäroider Mizellen voraus und ermittelten dabei für Lecithin/Cyclohexan-Systeme einen mittleren Partikelradius von bis zu  $r = 10$  nm. Dieser Wert ist im Vergleich zu den von Schurtenberger et al. ermittelten Zylinderquerschnitten viel zu groß [90]. Außerdem ähneln die von Aliotta et al. mit Neutronenstreuung (SANS) aufgenommenen Streukurven in ihrer Form den Streukurven dieser Arbeit, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die von den Autoren gemessenen Streuobjekte entgegen ihrer Voraussetzung keine Kugeln, sondern Zylinder sind. Unter speziellen Bedingungen, z.B. bei sehr hohen Temperaturen, können jedoch auch isometrische Assoziate vorliegen [185].

Röntgenkleinwinkelstreuung an arzneistofffreien inversen Mizellen aus Lecithin und IPM wurde bereits in kleinerem Umfang von Hamann [18, 103] und Papantoniou [107] durchgeführt. Die Streukurven und die Elektronenabstandsfunktionen von Hamann entsprechen denen dieser Arbeit; die zylindrischen Mizellen lassen sich aus den  $p(r)$ -Funktionen eindeutig ablesen. Die Streukurven von Papantoniou zeigen ein etwas anderes Aussehen. Die zugehörigen  $p(r)$ -Funktionen zeigen definitiv keine zylindrischen Partikel. Da jedoch die rheologischen Resultate aus Papantoniou's Arbeit klar auf ein Mizellwachstum zu Spaghettimizellen hinweisen, müssen die SAXS-Resultate aus [107] als fehlerhaft betrachtet werden.

#### 5.3.3 Betrachtung des mizellaren Querschnitts

Die bisherigen SAXS-Resultate haben gezeigt, dass es sich bei den Mizellen um dünne, lange Zylinder handelt. Das Wachstum zu Spaghettimizellen konnte bei allen solubilisier-



ten Arzneistoffen bestätigt werden. Unter der Annahme, dass es sich bei den Streuobjekten um Zylinder handelt, kann mit der ITP-92 Software die Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  des Zylinderquerschnitts errechnet werden [154, 160]. Bei diesem Verfahren, das in Kapitel 4.3 ausführlich beschrieben ist, wird von der Idealvorstellung eines unendlich langen und dünnen Zylinders als Streuobjekt ausgegangen. Die Ausgangsstreukurven sind dieselben wie in Abb. 5.19–5.25. Zur Auswertung wurde der innerste Teil der Streukurve, in dem die Informationen für die großen Abstände im Streuobjekt enthalten sind, abgeschnitten. Auf diese Weise kann der Fehler in  $p(r)$  minimiert werden [160]. Um bereits vor der Berechnung der  $p(r)$ -Funktionen Tendenzen für das Verhalten des Zylinderquerschnitts bei Arzneistoffzugabe zu erhalten, wurde eine Guinier-Auswertung zur Bestimmung des Streumassenradius  $R_q$  des Querschnitts durchgeführt. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abb. 5.27 zu sehen.

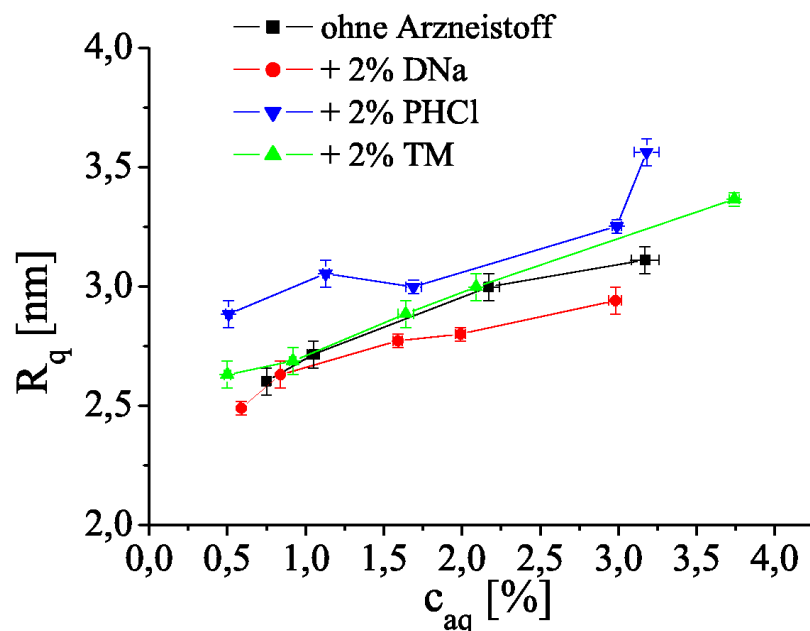


Abbildung 5.27: Streumassenradien nach Guinier für die Zylinderquerschnitte der mit verschiedenen Arzneistoffen beladenen inversen Mizellen in Abhängigkeit des Wassergehalts  $c_{aq}$ . Die Fehlerbalken resultieren aus der linearen Regression  $\ln[I(h) \cdot h]$  gegen  $h^2$ .

Zu erkennen ist, dass der Zylinderquerschnitt mit zunehmendem Wassergehalt geringfügig, aber signifikant zunimmt. In Gegenwart von DNA ist eine äußerst geringe Verkleinerung des Querschnitts im Vergleich zu den arzneistofffreien Systemen angedeutet, während TM den Querschnitt nicht signifikant beeinflusst. Letzteres ist insofern unerwartet, als gerade TM die Länge der Mizellen erheblich verringert. Pilocarpin-HCl vergrößert den Querschnitt bei allen Wassergehalten leicht gegenüber den unbeladenen

Mizellen. Die Absolutwerte der Guinier-Auswertung haben keine Aussagekraft, da sie vor der ITP-Auswertung aus den verschmierten Streukurven gewonnen wurden.

Die Elektronenabstandsfunktionen für die Zylinderquerschnitte sind in den Grafiken 5.28–5.31 abgebildet.

**Zur allgemeinen Interpretation der Elektronenabstandsfunktionen:** Wie schon durch die Streumassenradien angedeutet, nimmt die Ausdehnung des Querschnitts mit zunehmendem Wassergehalt für jede Arzneistoffbeladung leicht zu. Durch die Hydratation der polaren Kopfgruppe des Lecithins kommt es demzufolge nicht nur zu einem Wachstum zu Spaghettimizellen, sondern auch zu einer leichten Quellung des Querschnitts. Die Kurven sind nur leicht anisometrisch. Das Maximum der Elektronenabstandsfunktionen liegt etwa bei  $r = 1 - 1.2$  nm und gibt die kleine Halbachse an, während die große Achse durch die Gesamtausdehnung gegeben ist und damit aus dem Schnittpunkt der  $p(r)$ -Funktion mit der Abszisse zu ermitteln ist. Die große Achse hat eine Ausdehnung von – je nach Wassergehalt –  $r = 2.5 - 3.5$  nm. Der Querschnitt des polaren Kerns der inversen Zylindermizellen ist demnach eine nur schwach anisometrische Ellipse, deren kleine Achse  $r_a = 2 - 2.4$  nm und deren große Achse  $r_b = 2.5 - 3.5$  nm misst. Das Achsenverhältnis im elliptischen Querschnitt beträgt etwa  $1:1.2 - 1:1.6$  und ändert sich nicht signifikant durch Wasser- oder Arzneistoffzugabe.

Studien zur Bestimmung des Zylinderquerschnitt-Profiles von Spaghettimizellen sind relativ selten in der Literatur zu finden. Schurtenberger et al. gaben aus mit Neutronenstreuung (SANS) erhaltenen Streukurven einen Radius von  $r = 3.0 \pm 0.1$  nm für den Querschnitt von Lecithin/*i*-Octan-Mizellen an [2]. Im Vergleich zu den Querschnittsradien aus dieser Arbeit ist dieser Wert um den Faktor 2-2.5 größer. Es muss jedoch beim Vergleich von SAXS- und SANS-Daten berücksichtigt werden, dass mit SANS die Mizelle als Ganzes erfasst werden kann, während mit SAXS nur der in der Elektronendichte von der Umgebung verschiedene mizellare Kern sichtbar ist. Gröhn et al. quantifizierten diesen Effekt durch einen SAXS-SANS-Vergleich an inversen zylindrischen Polymermizellen [187] und erhielten Diskrepanzen, die mit denen zwischen den in dieser Arbeit erzielten SAXS-Resultaten und den SANS-Ergebnissen von Schurtenberger et al. grob übereinstimmen [2, 90]. Ebenfalls mit SANS fanden Schurtenberger et al., dass der Querschnitt von Lecithin/Cyclohexan-Spaghettimizellen bei Solubilisation von Wasser geringfügig von  $r = 6$  nm auf  $r = 7.5$  nm anwächst [90].

An den Elektronenabstandsfunktionen des mizellaren Querschnitts fällt weiterhin auf, dass die Mizellen mit geringem Wassergehalt eine deutliche Oszillation in den negativen

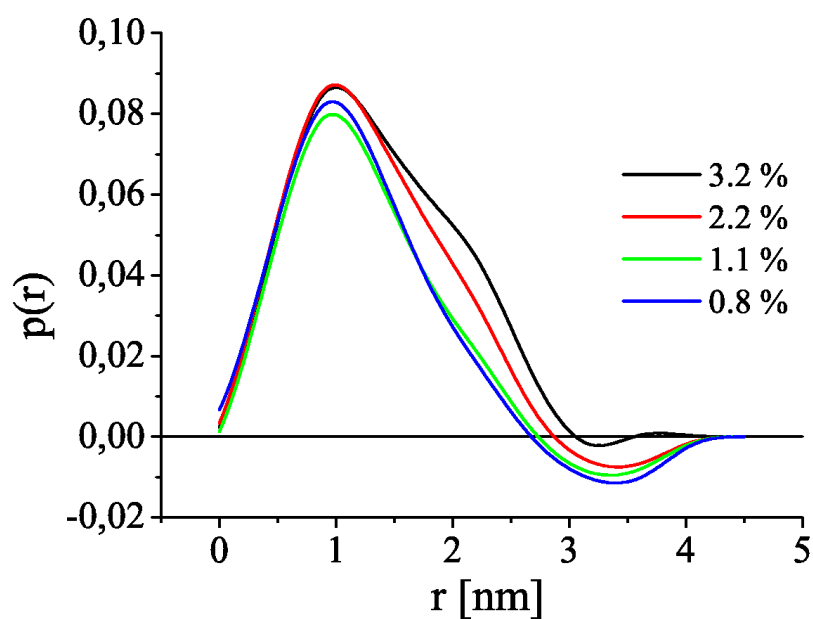


Abbildung 5.28: Elektronenabstandsfunctionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für die verdünnten, arzneistofffreien Standard-IML bei verschiedenen Wasseranteilen [%].

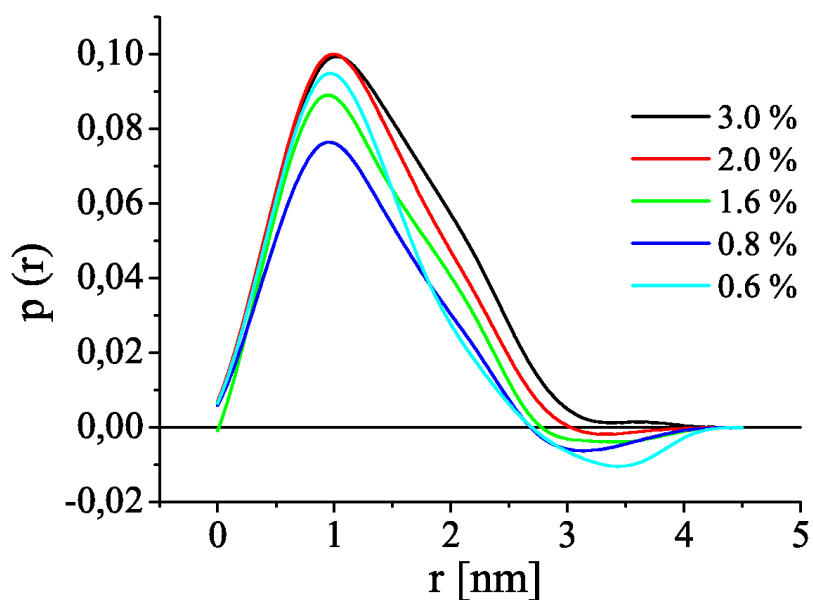


Abbildung 5.29: Elektronenabstandsfunctionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für die verdünnten Standard-IML mit 2% Diclofenac-Na bei verschiedenen Wasseranteilen [%].

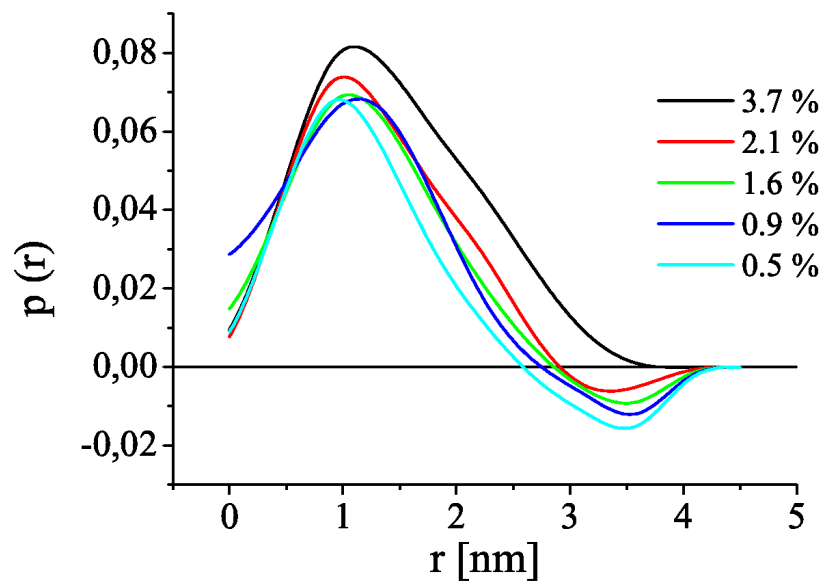


Abbildung 5.30: Elektronenabstandsfunktionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für die verdünnten Standard-IML mit 2% Timolol-Hydrogenmaleat bei verschiedenen Wasseranteilen [%].

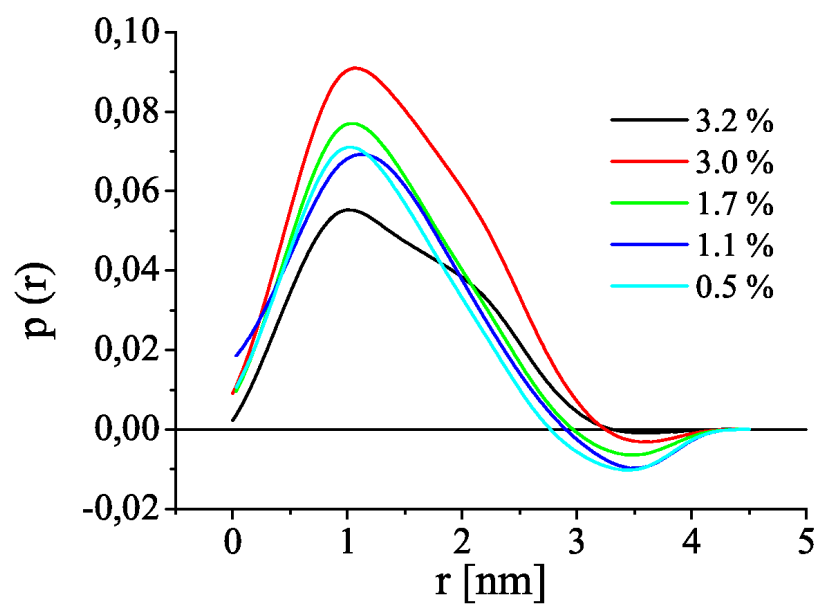


Abbildung 5.31: Elektronenabstandsfunktionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für die verdünnten Standard-IML mit 2% Pilocarpin-HCl bei verschiedenen Wasseranteilen [%].

Bereich bei hohen  $r$  aufweisen. Erklärt wird dieses Phänomen durch die Abweichung von der Idealvorstellung unendlich langer Zylinder [167]. Im Allgemeinen lassen sich zufriedenstellende Resultate erzielen, wenn das Verhältnis zwischen der Zylinderlänge und der maximalen Dimension des Querschnitts größer als 2.5 ist [188]. Für die meisten der untersuchten Mizellen ist dies der Fall (Abb. 5.20–5.26). Einzig bei den Systemen mit TM und geringen Wasseranteilen kann es diesbezüglich Probleme geben; die zugehörigen Abstandsfunktionen des Querschnitts (Abb. 5.30) weisen demzufolge auch besonders ausgeprägte Schwingungen ins Negative auf. In der Literatur sind unterschiedliche Methoden zur Auswertung dieser Elektronenabstandsfunktionen zu finden. Gröhn et al. gehen davon aus, dass der Nulldurchgang unabhängig vom weiteren Verlauf der Kurve entscheidend für das Ausmaß der Ausdehnung des Querschnitts ist [187]. Für Kugel-

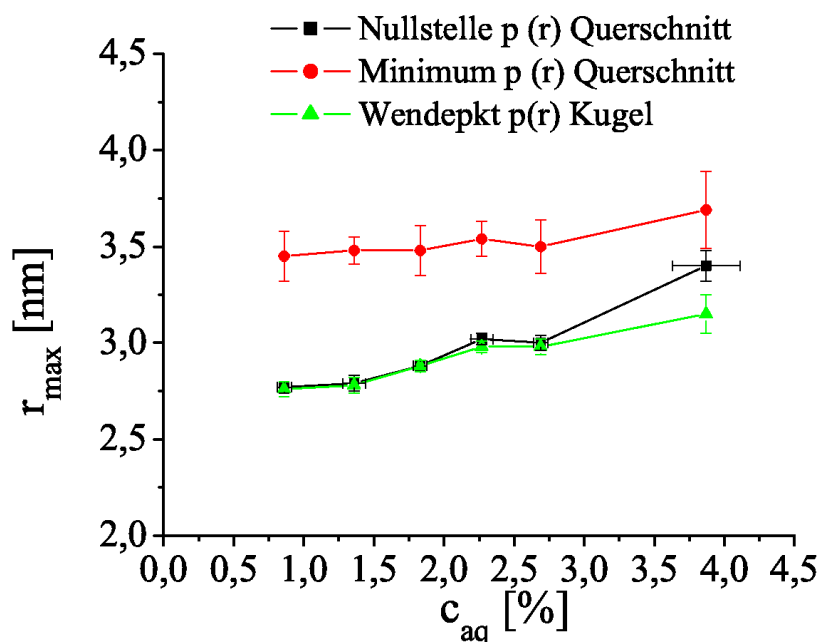


Abbildung 5.32: Vergleich dreier Methoden zur Ermittlung der maximalen Ausdehnung des Zylinderquerschnitts aus den Elektronenabstandsfunktionen für die arzneistofffreie, verdünnte Standard-IML. (a) Abszissenschnittpunkt, schwarz; (b) Minimum der negativen Oszillation, rot; (c) Wendepunkt der Abstandsfunktion nach Kugelsymmetrie, grün. Die Fehlerbalken resultieren aus geschätzten Ableseungenauigkeiten.

mizellen fanden Kratky und Müller, dass die Oszillationen für zu hoch konzentrierte Systeme Folge der interpartikulären Wechselwirkungen sind. Die maximale Ausdehnung der Partikel ist in diesem Fall nicht der Nulldurchgang der  $p(r)$ -Funktion, sondern das nachfolgende Minimum der negativen Oszillation [143, 189]. Diese interpartikulären Effekte können jedoch für stark anisometrische Partikel in solch geringen Konzentrationen ausgeschlossen werden [139]. Dennoch wurde von Berlepsch et al. eine Kurve

an die  $p(r)$ -Funktion des Querschnitts approximiert, die die Oszillation negiert und die Nullstelle mit dem Minimum der ursprünglichen  $p(r)$ -Funktion übereinstimmen lässt [167]. Als weitere Methode zur Bestimmung der Ausmaße des Zylinderquerschnitts kann der Wendepunkt der nach postulierter Kugelsymmetrie erhaltenen Elektronenabstandsfunktionen (Abb. 5.20– 5.26) bestimmt werden, was hinreichend genaue Resultate liefert [166, 167].

In Abbildung 5.32 sind die Resultate für die maximale Dimension  $r_{max}$  des Zylinderquerschnitts arzneistofffreier Standard-IML, die nach den oben erwähnten 3 Methoden ermittelt wurden, gegenübergestellt. Der Nulldurchgang und das Minimum der Abstandsfunktion des Querschnitts wurden direkt aus den Kurven abgelesen (Abb. 5.28). Der Wendepunkt der  $p(r)$ -Funktionen nach Kugelsymmetrie (Abb. 5.20) wurde mit ORIGIN<sup>R</sup> aus der Nullstelle der 2. Ableitung von  $p(r)$  ermittelt. Der Vergleich an den

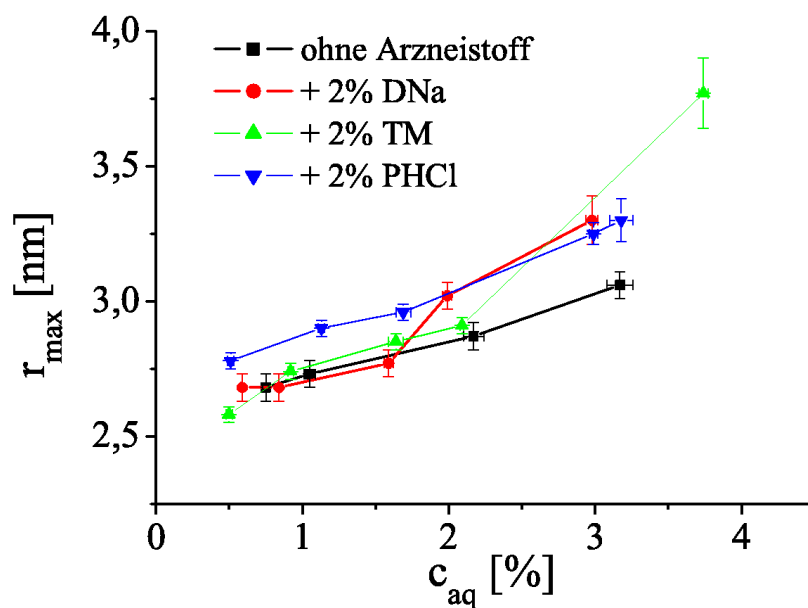


Abbildung 5.33: Maximale Ausdehnung  $r_{max}$  der Zylinderquerschnitte der mit verschiedenen Arzneistoffen beladenen inversen Mizellen in Abhängigkeit des Wassergehalts  $c_{aq}$ . Die Fehlerbalken resultieren aus geschätzten Ableseungenauigkeiten.

arzneistofffreien Mizellen zeigt, dass die Wendepunkts- und die Nulldurchgangsmethode nahezu identische Resultate liefern, während die der Minimumsmethode deutlich von diesen Resultaten abweichen. Für alle anderen Systeme konnten ähnliche Erkenntnisse gewonnen werden, die als Konsequenz die Bestimmung der Querschnittsgröße aus dem Nulldurchgang der  $p(r)$ -Funktion des Zylinderquerschnitts als Standardmethode

rechtfertigen. Die mit dieser Methode ermittelten Querschnittsgrößen sind in Abb. 5.33 zusammengestellt.

Die Resultate für  $r_{max}$  bestätigen im Großen und Ganzen die Tendenzen aus der Guinier-Auswertung. Mit zunehmendem Wassergehalt nimmt der Querschnitt leicht zu. Während die arzneistofffreien Mizellen einen vergleichsweise geringen Querschnitt aufweisen, steigt  $r_{max}$  bei höheren Wasseranteilen für die mit TM und DNa beladenen Mizellen deutlicher an. Die mit PHCl beladenen inversen Mizellen zeigen dagegen durchgehend einen signifikant größeren Querschnitt als die arzneistofffreien Assoziate. Mit *Molecular Modelling*-Berechnungen konnte die Ausdehnung des polaren Teils des Lecithins auf etwa 1.1 nm im gestreckten Zustand angegeben werden. Dieser Wert entspricht in etwa der kleinen Halbachse der elliptischen mizellaren Querschnitte. Es lässt sich demnach schlussfolgern, dass es keinen Platz für eventuelles Bulkwasser in den Assoziaten geben kann. Modelle für den Aufbau der Mizellen sind in Kapitel 6 zu finden. Zwei Gründe für das Anwachsen der mizellaren Kerne mit zunehmendem Wassergehalt können diskutiert werden:

1. Durch die Hydratation der Kopfgruppe nimmt deren Volumen zu. Dadurch steigt der Platzbedarf der polaren Kopfgruppe des Lecithins [101, 190] und der Querschnitt der Mizellen nimmt zu. Die ersten Wassermoleküle sorgen jedoch für das Mizellwachstum zu Spaghettimizellen und werden eher lateral zwischen die Phospholipidmoleküle eingebaut [84].
2. Capitani et al. konnten zeigen, dass die Kopfgruppe des unhydratisierten Lecithins in der angewinkelten gauche-Konformation vorliegt. Die positiv geladene Trimethylammonium (TMA)-Gruppe ist dadurch nah bei der negativen Phosphatgruppe. Das erste Wassermolekül, das die Phosphatgruppe hydratisiert, sorgt für eine Verminderung der Wechselwirkungen zwischen der TMA- und der Phosphatgruppe, was zu einer Entfaltung der Kopfgruppe in die trans-Konformation führt [80]. In der trans-Konformation ist die Kopfgruppe durch die Entfaltung lang ausgestreckt, was letztendlich für größere Mizellen sorgt. Eine Entfaltung durch einen langsamen Übergang von der gauche- in die trans-Konformation in inversen Spaghettimizellen fanden Shumilina et al. durch FTIR-Spektroskopie [84]. Dieses Verhalten würde zusammen mit der Volumenzunahme durch die Hydratation die langsame, kontinuierliche Zunahme des Querschnitts erklären.

Neben Wasser sorgt Pilocarpin-HCl für ein Anwachsen des mizellaren Querschnitts. Akutsu und Nagamori beschreiben eine durch Kationen induzierte Konformationsänderung von gauche nach trans für die polare Kopfgruppe von Phospholipiden [191]. Es ist davon auszugehen, dass sich das protonierte Pilocarpin-Kation an die Phosphatgruppe

anlagert und somit die Wechselwirkung zwischen TMA-Gruppe und Phosphatgruppe deutlich herabsetzt. Die O–C–C–N-Kette des polaren Kopfbereiches liegt daraufhin verstärkt in der trans-Konformation vor und sorgt nach obiger Theorie für ein Anwachsen des mizellaren Querschnitts. Ein weiterer Grund für diese Zunahme könnte durch die Anlagerung des voluminösen Pilocarpin-Moleküls in die Kopfregion des Lecithins erklärbar sein. Nach der bisherigen Theorie müsste auch Timolol-Hydrogenmaleat für ein Anwachsen des mizellaren Querschnitts sorgen, was jedoch weitestgehend ausbleibt. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass zumindest bei kleinen  $c_{aq}$  die TM-haltigen inversen Mizellen eher sphäroid als zylindrisch sind und die Modellannahme für die Auswertung mit ITP demnach nicht mehr zutrifft.

Da die Arzneistoffe in den betrachteten Konzentrationen von 2% einen nur geringen Einfluss auf Form und Größe der inversen Mizellen haben, wurde eine weitere SAXS-Studie an Standard-IML mit variabler Arzneistoffkonzentration durchgeführt. Aus diesen Resultaten werden genauere Aufschlüsse über den Einbau der Arzneistoffe und die Folge für das Mizellwachstum erwartet.

### 5.3.4 SAXS an Systemen mit variabler Arzneistoffkonzentration

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden die Standard-IML mit Arzneistoffen in verschiedenen Konzentrationen von 1% bis 8% hergestellt und nach anschließender Verdünnung mit SAXS untersucht. Der Restwassergehalt der untersuchten Proben lag vor der Verdünnung zwischen  $c_{aq} = 0.46\% - 0.66\%$ . Zum Vergleich mit dem hydrophilen PHCl wurden Studien mit Pilocarpin-Base (PBase) in entsprechenden Konzentrationen durchgeführt. Wenn die Theorie mit der durch das Kation induzierte Konformationsänderung mit nachfolgendem Zuwachs des mizellaren Querschnitts zutreffend ist, darf dieser Effekt bei PBase nicht auftreten. Es wurden hergestellt:

- Standard-IML ohne Arzneistoff als Referenz
- Standard-IML mit DNa in Konzentrationen von 2%, 4% und 8%
- Standard-IML mit TM in Konzentrationen von 1%, 2% und 4%
- Standard-IML mit PHCl bzw. PBase in Konzentrationen von 1%, 2% und 4%

Die Elektronenabstandsfunktionen nach postulierter Kugelsymmetrie bzw. des Zylinderquerschnitts sind in den Grafiken der Abb. 5.34–5.41 aufgeführt.

Eine Solubilisierung von **Diclofenac-Na** bewirkt offenbar einen konzentrationsabhängigen Effekt. Das Einarbeiten von 2% DNa erhöht die Länge der Mizellen zunächst, bei



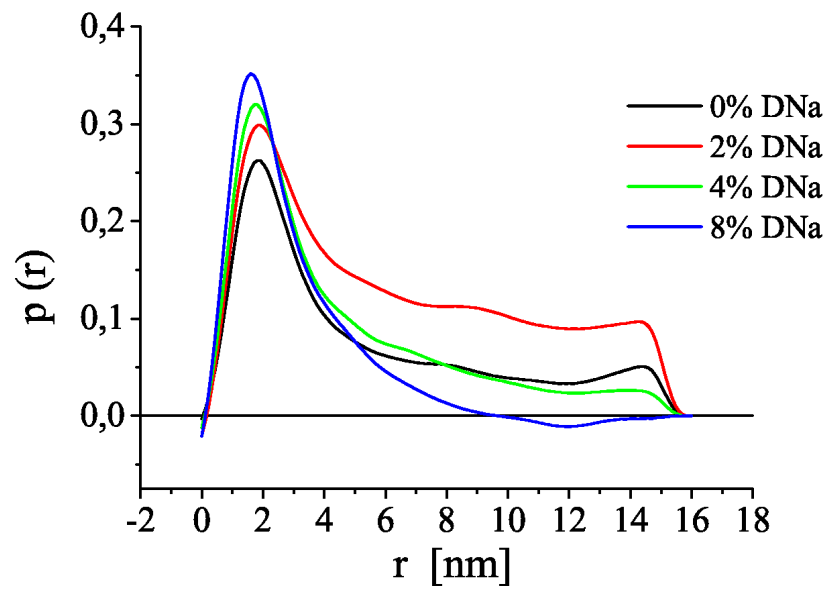


Abbildung 5.34: Elektronenabstandsfunctionen nach postulierter Kugelsymmetrie für verdünnte Standard-IML mit 0%–8% Diclofenac-Na.

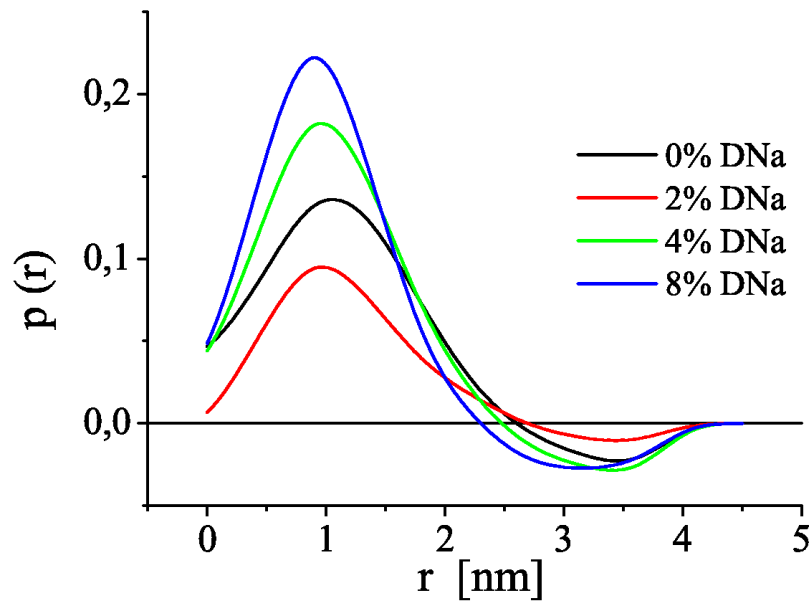


Abbildung 5.35: Elektronenabstandsfunctionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für verdünnte Standard-IML mit 0%–8% Diclofenac-Na.

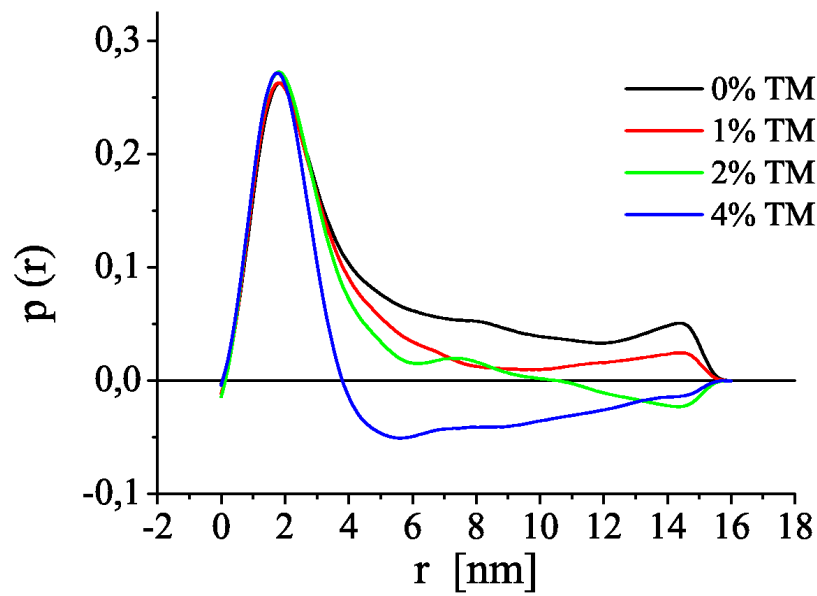


Abbildung 5.36: Elektronenabstandsfunktionen nach postulierter Kugelsymmetrie für verdünnte Standard-IML mit 0%–4% Timolol-Hydrogenmaleat.

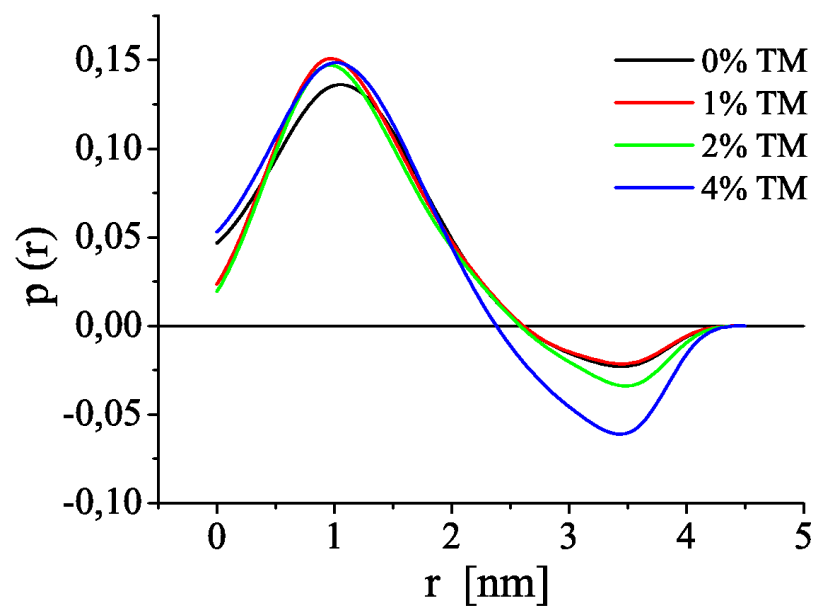


Abbildung 5.37: Elektronenabstandsfunktionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für verdünnte Standard-IML mit 0%–4% Timolol-Hydrogenmaleat.

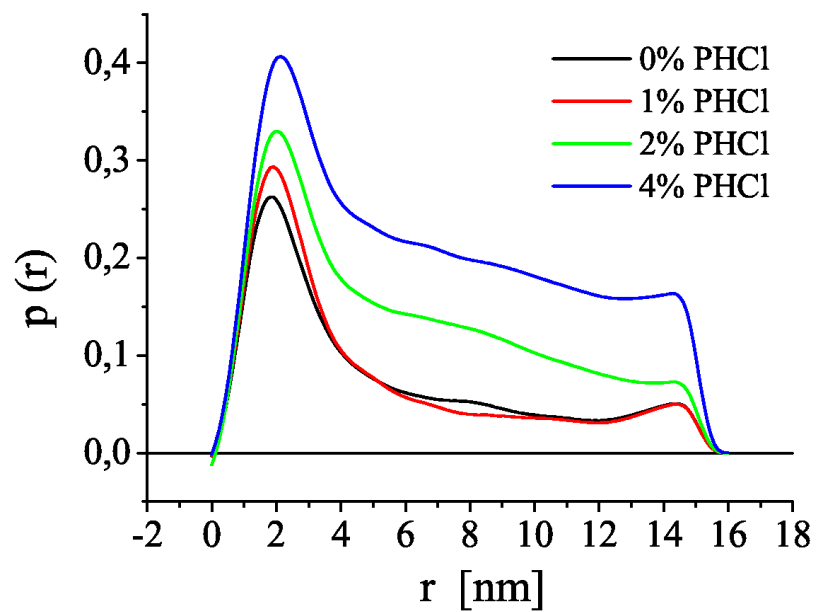


Abbildung 5.38: Elektronenabstandsfunktionen nach postulierter Kugelsymmetrie für verdünnte Standard-IML mit 0%–4% Pilocarpin-HCl.

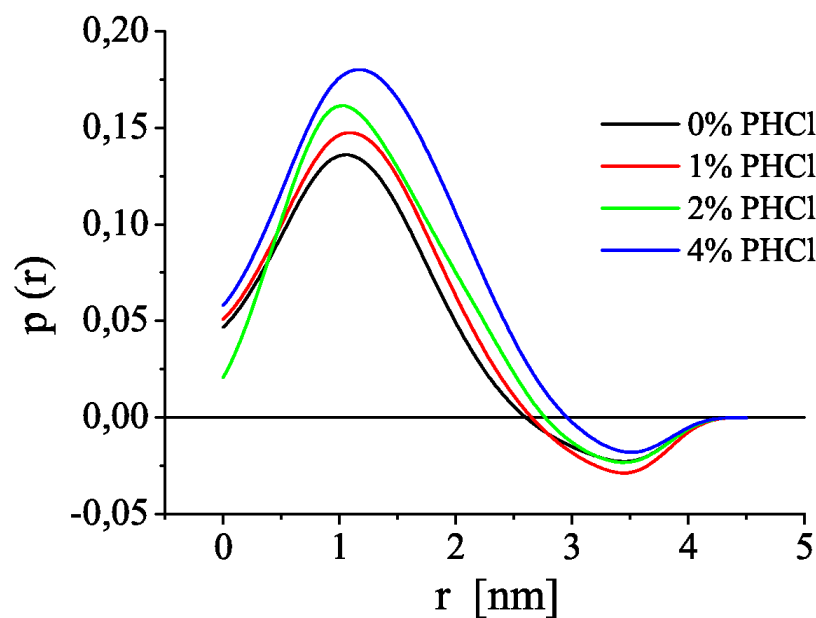


Abbildung 5.39: Elektronenabstandsfunktionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für verdünnte Standard-IML mit 0%–4% Pilocarpin-HCl.

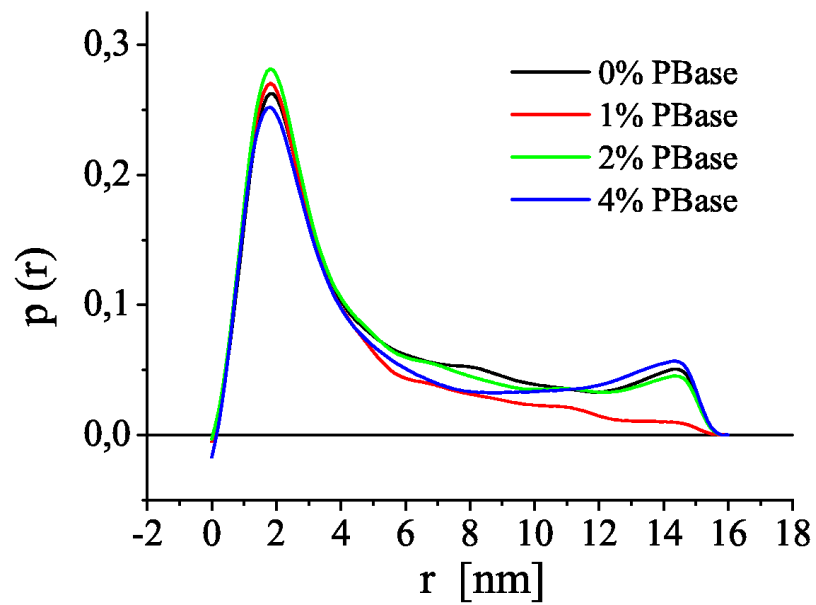


Abbildung 5.40: Elektronenabstandsfunktionen nach postulierter Kugelsymmetrie für verdünnte Standard-IML mit 0%–4% Pilocarpin-Base.

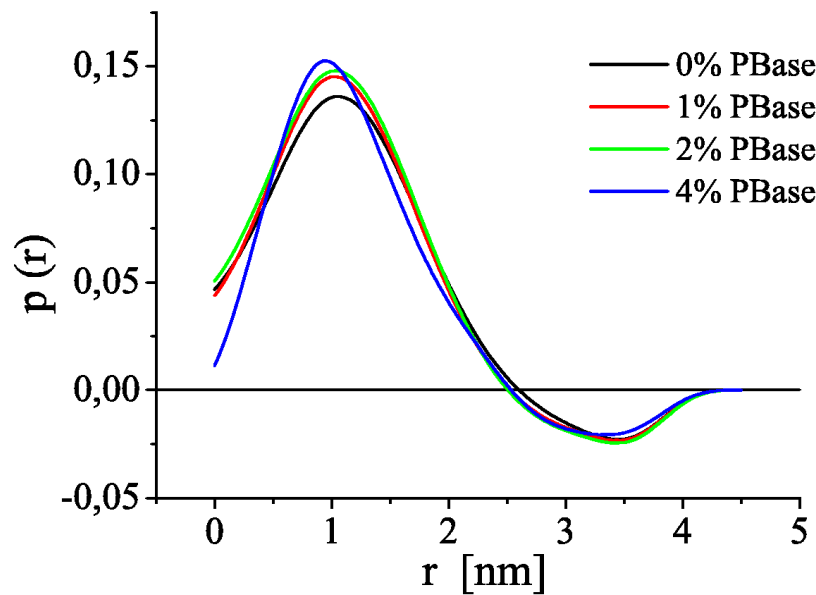


Abbildung 5.41: Elektronenabstandsfunktionen des mizellaren Zylinderquerschnitts für verdünnte Standard-IML mit 0%–4% Pilocarpin-Base.

höheren Konzentrationen nimmt die Länge deutlich ab (Abb. 5.34). Ähnliches gilt für die Ausdehnung des Zylinderquerschnitts. Bei geringen Konzentrationen ist keine Änderung festzustellen, hohe Konzentrationen verringern die Maße des Querschnitts merkbar (Abb. 5.35 und 5.42). Die Verkleinerung der Mizellen bei hoher DNA-Konzentration überrascht zunächst, weil die Zähigkeit der Systeme nach qualitativer Begutachtung nicht ab- sondern eher zunimmt. Als Begründung dafür mag gelten, dass der Massenanteil der Mizellen in der Lösung durch eine Zugabe von 8% DNA merklich zugenommen hat, da DNA selbst amphiphile Eigenschaften aufweist. Hamann zeigte, dass bei etwa 30% Lecithin in IPM die Viskosität bei weiterer Erhöhung der Lecithinkonzentration exponentiell zunimmt [18]. Eine massive Viskositätserrhöhung durch eine Zugabe von 8% DNA, wie sie von Papantoniou quantifiziert wurde [15] ist somit auch ohne eine wesentliche Änderung der Mizellform zu erklären. Die Abnahme des Querschnittsradius ist durch den Einbau der DNA-Moleküle zu erklären. Das Diclofenac-Anion wird vermutlich an der positiven TMA-Gruppe lokalisiert sein, die sich allerdings weit im Inneren des polaren Kerns der Mizelle befindet. Aus Affinitätsgründen zieht es das amphiphile Diclofenac-Anion jedoch etwas aus dem Kern heraus, so dass sich die lipophilen Teile möglichst im Bereich der Kohlenwasserstoffketten des Lecithins befinden. Dadurch nimmt es die TMA-Gruppe ein Stück weit mit, so dass die Entfaltung von der gauche- in die trans-Konformation weitestgehend verhindert wird. Die O-C-C-N-Kette ist in diesem Fall eher senkrecht zur Molekülachse orientiert. Als Folge schrumpft der Kern leicht zusammen und liegt etwas dichter gepackt vor. Letzteres erklärt die deutlich höhere Elektronendichte im Kern bei den Systemen mit 8% DNA. Dass DNA in hohen Konzentrationen den Netzebenenabstand lamellarer Flüssigkristalle signifikant herabsetzt, beschrieben Papantoniou [15], Friedrich [192] sowie Kriwet mit Diclofenac-Diethylamin an binären Lecithin/Wasser-Systemen [193]. Als Erklärung für dieses Verhalten wurde eine Konformationsänderung der Kohlenwasserstoffketten des Lecithins angenommen. Durch den interkalierenden Einbau der kürzeren DNA-Moleküle in die Lecithin-Bilayer kann es somit zu Faltungen der Kettenenden kommen [15, 193]. Aus folgenden Gründen erscheint diese Theorie als einzige Erklärung des Phänomens fraglich. So müsste es auch durch den Einbau von Pilocarbin-HCl, das ebenfalls lateral in die Lecithin-Bilayer eingefügt wird, zu einer Reduktion der Schichtdicke kommen, die jedoch ausbleibt [107]. Zudem deutet die Verkleinerung des Zylinderquerschnitts darauf hin, dass die Faltung der Kettenenden nicht die einzige Ursache der Verkleinerung der Bilayer-Schichtdicke ist, da mit SAXS nur der polare Kern der Mizellen gemessen wird. Die Reduktion muss deshalb zumindest teilweise im Kernbereich stattfinden, was für die oben erläuterte Theorie der Wechselwirkung zwischen DNA und Lecithin spricht. Andererseits fanden Hamann sowie Wilisch, dass das ähnlich wie Diclofenac-Na strukturierte Fenoprofen-Na den Netzebenenabstand binärer Flüssigkristalle Lecithin/Wasser proportional zum Anteil des Arzneistoffs kontinuierlich von  $d = 6.2$  nm auf  $d = 3.0$  nm reduziert [18, 194, 195]. Mes-

sungen von Kriwet an Lecithin/Diclofenac-Diethylamin/Wasser-Systemen bestätigten diese Reduktion der Schichtdicke [193]. Solch deutliche Reduktionen des Netzebenenabstands sind nicht allein mit Änderungen des Zustands der Kopfgruppe zu erklären. Es finden demzufolge Konformationsänderungen sowohl in der Kopfgruppe als auch in den Fettsäureresten statt und sorgen für eine Reduktion der lamellaren Schichtdicke.

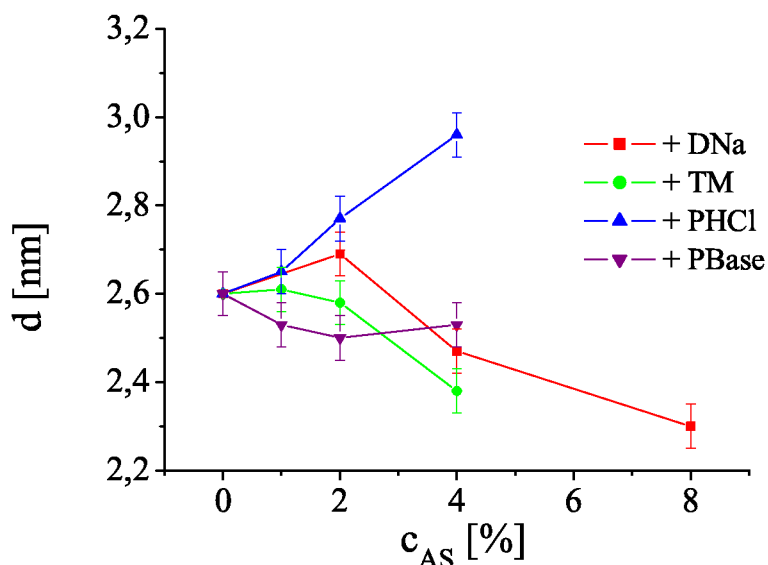


Abbildung 5.42: Ausdehnung des mizellaren Querschnitts in Abhängigkeit der Konzentration des solubilisierten Arzneistoffs für vier Modellarzneistoffe. Die Fehlerbalken resultieren aus der geschätzten Ableseungenauigkeit des Nulldurchgangs von  $p(r)$ .

Eine Verkürzung der Assoziate durch Diclofenac-Na stimmt nicht mit den Schlussfolgerungen von Hamann und Papantoniou überein, die den Packungsparameter durch einen Einbau von Fenoprofen-Na [103] bzw. Diclofenac-Na [107] unverändert sehen. Allerdings betrachtet Hamann das hydratisierte Molekül, das einen größeren Kopfbereich aufweist. Zusätzlich hat das Diclofenac-Na durch die beiden Chloratome den etwas voluminöseren lipophilen Teil, ist also eher konisch als zylindrisch. Eine weitere große Rolle für den Aufbau der inversen Mizellen spielt das IPM. Nach Erkenntnissen von Corswandt und Söderman wechselwirkt IPM mit den Kohlenwasserstoffketten des Lecithins und sorgt somit für eine erhöhte Flexibilität von Lecithin-Bilayern [196]. Findet eine solche Wechselwirkung statt, so muss das sich im Bereich der Fettsäurereste befindende IPM in den Packungsparameter des Lecithins mit eingerechnet werden und ihn somit deutlich erhöhen. Eine Erhöhung des Packungsparameters durch IPM ist allein deshalb zwingend erforderlich, weil der Packungsparameter von Phospholipiden im Grundzustand zwischen  $P = 0.8 - 1.0$  liegt [197, 198]. Aus diesen Erkenntnissen schlossen Aboofazeli und La-

wrence sowie Chen et al., dass die Penetration des öligen Lösungsmittels in den Bereich der Kohlenwasserstoffketten des Lecithins das Volumen  $v$  des Moleküls und damit den Packungsparameter  $P = v/a_0 l_c$  erhöht [199, 200], so dass eine spontane Assoziation zu inversen Mizellen letztendlich möglich wird. Es ist also aufgrund der Resultate dieser Arbeit davon auszugehen, dass Diclofenac-Na im Zusammenspiel mit IPM den Packungsparameter des Lecithins leicht erhöht. Diese Erhöhung kommt erst bei höheren Konzentrationen an DNA zum Tragen und bewirkt eine Verkleinerung der Assoziate durch eine größere Tendenz zur Ausbildung der Abrundungen an den Enden der zylindrischen Mizellen, der *end caps*. Im Widerspruch zu dieser Interpretation fand Hamann durch Beladung von Standard-IML mit ca. 5% Fenopropfen-Na eine deutliche Erhöhung der Länge der Aggregate, allerdings in Anwesenheit von ca. 1.5% Wasser [8, 103]. Dass in wässriger Umgebung der Einfluss von DNA wegen der Hydratisierung der Moleküle völlig anders aussehen kann, zeigte Schütze, der aufgrund eines durch den Einbau von DNA induzierten Phasenübergangs von Liposomen in Mischmizellen eine Verkleinerung des Packungsparameters postulierte [170]. Die geometrische Modellvorstellung der Wechselwirkung zwischen Lecithin und Diclofenac-Na in IPM ist in Abb. 5.43 zu sehen.

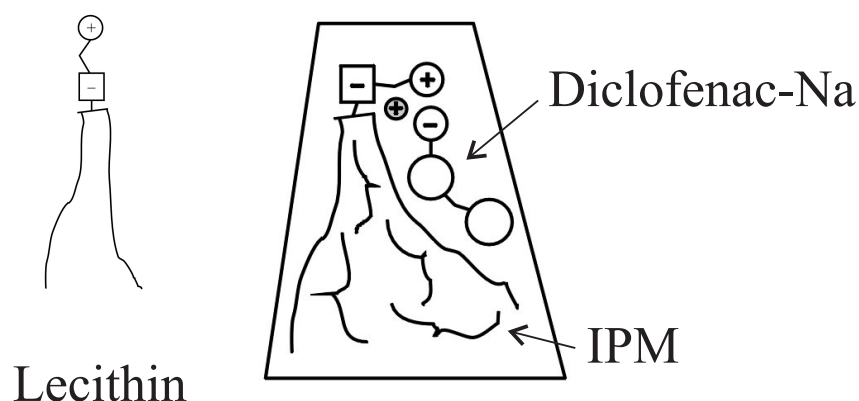


Abbildung 5.43: Geometrisches Modell der Wechselwirkung zwischen Phosphatidylcholin und Diclofenac-Natrium in IPM.

Die rheologischen Untersuchungen von Papantoniou [107] zeigen eine Verminderung der Viskosität mit zunehmender Arzneistoffkonzentration am Viskositätsmaximum, also bei hohen  $c_{aq}$ . Dieses kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass Diclofenac-Na als Sollbruchstelle im dynamischen *break and recombine*-Verhalten der inversen Mizellen dient. Diclofenac-Na schwächt demzufolge die Wechselwirkungen ab, die in arzneistofffreien Mizellen durch H-Brücken zwischen den Lecithin-Molekülen existieren.

Der Einbau von **Timolol-Hydrogenmaleat** in die IML sorgt für eine deutliche Abnahme der Mizellgröße (Abb. 5.36). Bereits bei Solubilisierung von 4% TM sind die Assoziate nahezu sphäroid. Für die Wechselwirkung von Fremdstoffen mit Phospholipiden in

inversen Spaghettimizellen werden zwei Modelle diskutiert.

Das erste Modell – mit dem die Wechselwirkungen zwischen Lecithin und DNA erklärt wurden – vergleicht die Bildungsenergien mizellarer *end caps* mit denen der Assoziation zu Spaghettimizellen. Je größer der Packungsparameter, desto größer ist auch die Tendenz, abgerundete Mizellenden auszubilden. Als Folge werden kleinere Assoziate erwartet. Wird der Packungsparameter durch Wasserzusatz oder durch Zusatz von anderen Fremdstoffen kleiner, so wird das Wachstum zu langen Assoziaten gegenüber der Bildung von *end caps* begünstigt, und es findet ein Wachstum zu Spaghettimizellen statt. Anhand dieser und anderer Überlegungen diskutierten Shchipunov et al. den Einbau von Alkylglykosiden in inverse Spaghettimizellen [81]. Auf die umfangreichen Berechnungen der freien Bildungsenergien in Abhängigkeit der Packungsparameter – wie von Angelico et al. durchgeführt [93] – soll hier nicht eingegangen werden.

Ein zweiter Interpretationsansatz legt zugrunde, dass der Zusammenhalt der langen Spaghettimizellen durch H-Brücken über Wassermoleküle zwischen den Phosphatgruppen der Lecithinmoleküle erfolgt [84, 85]. Stoffe, die interkalierend eingebaut werden, müssen demzufolge ebenfalls H-Brücken ausbilden können, oder wie das DNA über elektrostatische Wechselwirkungen in die Mizellen eingefügt werden (Abb. 5.43). Substanzen, die nur eine H-Brücke ausbilden können, wie z.B. Dimethylformamid können benachbarte Lecithinmoleküle nicht verbinden und unterbrechen damit die Assoziation zu Spaghettimizellen [85].

Beim Timolol-Hydrogenmaleat treffen mehrere dieser Bedingungen zu, die in Verbindung eine Verkleinerung der Mizellen verursachen. Erstens ist der lipophile Rest des Timolols sehr voluminös [192] und vergrößert daher den Packungsparameter stark. Zweitens ist eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Timolol-Kation und der negativen Phosphatgruppe möglich, wie er von Lindell et al. an negativ geladenen Phospholipiden nachgewiesen wurde [183]. Für zwitterionische Lecithine diskutieren die Autoren einen Einfluss von H-Brückenbindungen auf die Bindung des Timolol-Kations an die Lecithinmoleküle. Möglich wäre, dass durch die elektrostatischen Wechselwirkungen Komplexe zwischen Timolol und Lecithin gebildet werden, die einen Abbruch der Mizellbildung herbeiführen können. Drittens kann das Timolol mehrere H-Brücken ausbilden, damit Verzweigungen und Abbrüche der Mizellen induzieren, die ebenfalls eine Verkleinerung bewirken [81]. Ein Zusammenwirken dieser möglichen Ursachen würde das Mizellwachstum stark beeinträchtigen und für eine drastisch reduzierte Mizellgröße sorgen, wie sie durch die SAXS-Experimente ermittelt wurde. Für hohe Wasseranteile ist jedoch keine signifikante Verkleinerung der Mizellen mit SAXS zu beobachten. Erklären



lässt sich dieses Phänomen mit einer Abschwächung der Wechselwirkungen zwischen den Phospholipidmolekülen durch den Einbau von TM. Die Spaghettimizellen werden demnach zwar ausgebildet, zerbrechen aber bei minimalen Beanspruchungen an den durch das TM gebildeten „Sollbruchstellen“, um an anderer Stelle wieder zu rekombinieren [94, 201]. Dieser dynamische *break and recombine*-Prozess kann allgemein Diskrepanzen zwischen der Mizellgröße und der Viskosität der Systeme erklären.

Eine Verkleinerung des Zylinderquerschnitts, wie sie in Abb. 5.42 angedeutet ist, erscheint nach diesem Modell unwahrscheinlich. Es ist jedoch unklar, ob der Querschnitt tatsächlich kleiner wird, da es sich bei den Systemen mit hohem TM-Gehalt definitiv nicht mehr um Zylinder handelt. Die Modellannahme für die Berechnung der Querschnittsprofile [139] trifft für diese Systeme nicht mehr zu und die  $p(r)$ -Funktionen des Querschnitts müssen demzufolge als fehlerbehaftet angesehen werden. In Abb. 5.44 ist ein Modell der Wechselwirkung zwischen Lecithin und TM dargestellt.

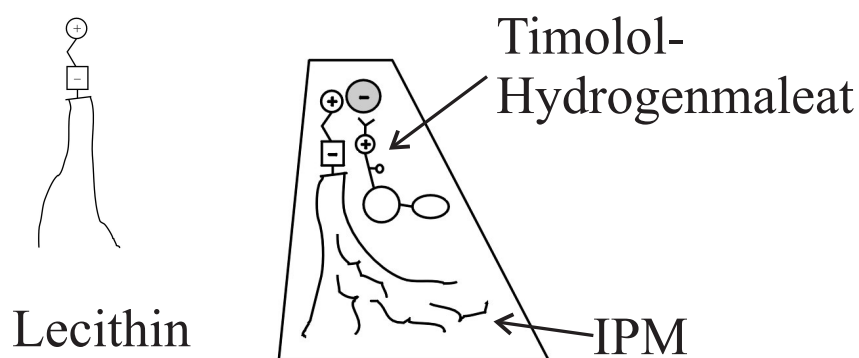


Abbildung 5.44: Geometrisches Modell der Wechselwirkung zwischen Phosphatidylcholin und Timolol-Hydrogenmaleat in IPM.

Die rheologischen Experimente von Müller bestätigen die Verkleinerung der Assoziate durch eine deutlich reduzierte Viskosität schon bei Solubilisierung geringer Mengen an TM [3]. Die hohe Wassermenge, die zum Phasenübergang in eine flüssigkristalline Phase benötigt wird, unterstützt die Theorie des veränderten Packungsparameters. Eine größere Menge an Wasser ist nötig, um den Packungsparameter wieder nahe  $P = 1$  zu bringen, wo Lamellen ausgebildet werden können. Unklar in dieser Theorie ist noch die Rolle des Maleat-Anions, das bei einer angenommenen Wechselwirkung mit der TMA-Gruppe den Packungsparameter verkleinert.

Das Modell zum Einbau von **Pilocarpin-HCl** in die inversen Mizellen ist weniger kompliziert. Erstens ist PHCl komplett hydrophil, weshalb es aus thermodynamischen

Gründen vollständig im polaren Kern lokalisiert sein wird. Zweitens kann es ähnlich wie Wasser und die von Shchipunov beschriebenen Substanzen Formamid und Glycerol – im Gegensatz zum weiter oben angesprochenen Dimethylformamid – mindestens zwei H-Brücken ausbilden und damit die Phosphatgruppen benachbarter Lecithinmoleküle verketteten [85]. Damit induziert PHCl wie Wasser ein Wachstum zu Spaghettimizellen, wie es in Abb. 5.38 dargestellt ist. Durch den reduzierten Packungsparameter nimmt die Tendenz zur Bildung von Spaghettimizellen gegenüber der Bildung abgerundeter *end caps* zu. Der Querschnitt nimmt zu, weil (a) die Anwesenheit eines großen Kations eine Streckung der O–C–N-Kette in die trans-Konformation bewirkt [191] und (b) ein großes Molekül im polaren Bereich so eingebaut sein kann, dass sich der polare Bereich insgesamt leicht ausdehnt. Ein geometrisches Modell zum Einbau von PHCl ist in Abb. 5.45 zu sehen.

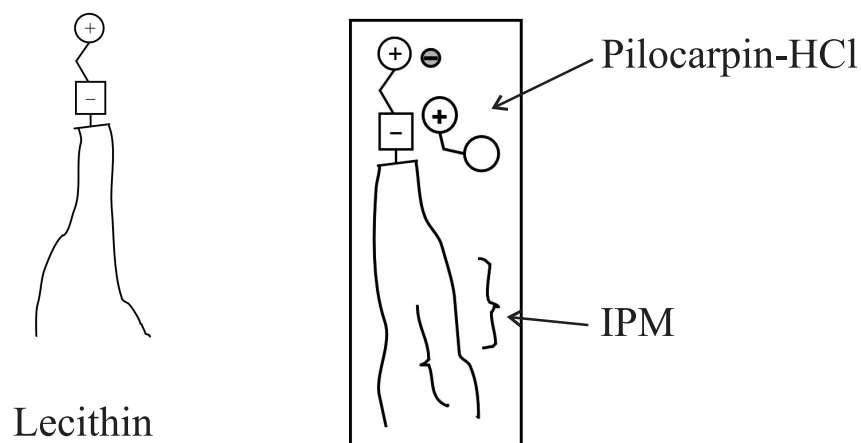


Abbildung 5.45: Geometrisches Modell der Wechselwirkung zwischen Phosphatidylcholin und Pilocarpin-HCl in IPM. In der Abbildung wurde ein Packungsparameter von  $P = 1$  dargestellt. Der reale Packungsparameter wird jedoch etwas größer als Eins angenommen.

Die Höhe des Viskositätsmaximums wächst bei geringen PHCl-Konzentrationen an, um dann bei etwa 4% PHCl abzunehmen [107]. Da das Zylinderwachstum mit hoher PHCl-Konzentration zunimmt, muss davon ausgegangen werden, dass die Bindungen von Pilocarpin an die Phosphatgruppen schwächer sind als die von Wasser. Des weiteren wurde von Papantoniou eine wesentlich geringere Wassermenge zum Erreichen des Phasenübergangs PHCl-haltiger inverser Mizellen in lamellare Flüssigkristalle angegeben [107]. Da das von Papantoniou gemessene starke Größenwachstum der Mizellen bei PHCl-Solubilisierung in diesem Ausmaß nicht reproduziert werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass die von Papantoniou untersuchten Systeme nicht vollständig wasserfrei waren. Dafür spricht, dass Papantoniou bei der Evaporisation des Wassers nur

so lange gewartet hat, bis „...die Lösung klar wurde“ [107]. Ist dieser Punkt erreicht, ist noch ein beträchtlicher Restwassergehalt in den Systemen vorhanden. Eine geringere Wassermenge zum Erreichen des Phasenübergangs erscheint zwar wegen des niedrigen Packungsparameter konsequent, konnte aber in der vorliegenden Arbeit für die mit 2% PHCl beladene Standard-IML nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zu PHCl verändert Pilocarpin-Base die Form der inversen Mizellen nicht signifikant (Abb. 5.40– 5.41). Es sind deutliche Unterschiede im Solubilisationsverhalten von PHCl und Pilocarpin-Base vorhanden. Damit sprechen die Resultate für die Theorie von Akutsu und Nagamori, die besagt, dass das Pilocarpin-Kation bei Anlagerung an die Phosphatgruppe des Lecithins eine Entfaltung der O–C–N-Kette von der gauche- in die trans-Konformation induziert [191]. Dieser Interpretation folgend sollte Pilocarpin-Base die Ausmaße des mizellaren Querschnitts nicht verändern, was auch nicht der Fall ist. Nicht auszuschließen ist aufgrund der Resultate jedoch auch, dass das eher lipophile Molekül der Base gar nicht in den Mizellen solubilisiert, sondern im IPM gelöst vorliegt.

## 5.4 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Lecithin und Arzneistoff

Im letzten Kapitel wurde der Einfluss solubilisierter Arzneistoffe auf das durch Wasser induzierte Wachstum inverser Lecithin-Mizellen zu Spaghettimizellen untersucht und diskutiert. Im Vordergrund standen dabei Untersuchungen von Größen- und Formänderungen der Assoziate mit Röntgenkleinwinkelstreuung. Basierend auf den Resultaten der SAXS-Messungen wurden Modellhypothesen aufgestellt, wie die Phospholipide mit den solubilisierten Arzneistoffen wechselwirken. Zur Verifizierung dieser Modelle wurden spektroskopische Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Lecithin und Arzneistoff durchgeführt. Durch eine Quantifizierung dieser Wechselwirkungen kann ermittelt werden, mit welchen funktionellen Gruppen des Phospholipids solubilierte Arzneistoffe und Wasser wechselwirken. Als Methoden dienten Phosphor-NMR und Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie (FTIR). Grundlage der Diskussion sind die Wechselwirkungsmodelle aus Abb. 5.43–5.45.

### 5.4.1 Kernresonanzspektroskopie ( $^{31}\text{P}$ -NMR)

Der Phosphorkern des Lecithins kann als Spin- $\frac{1}{2}$ -Kern im äußeren Magnetfeld zwei Energiezustände  $E_+$  und  $E_-$  annehmen, und zwar:

$$E_{+/-} = E_0 \pm \frac{1}{2} \gamma \hbar B \quad (5.2)$$

In dieser Gleichung bezeichnet  $E_0$  die ungestörte Energie des Kerns im äußeren Magnetfeld  $B$ . Das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  ist eine Konstante, die vom inneren Aufbau des Kerns abhängt [19].  $\hbar = h/2\pi$  bezeichnet das Planck'sche Wirkungsquantum. Nach der Boltzmann-Statistik befinden sich mehr  $^{31}\text{P}$ -Kerne im Zustand niedrigerer Energie:

$$\frac{N_-}{N_+} = \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (5.3)$$

( $N_+$  bzw.  $N_-$ : Anzahl der P-Kerne im höheren bzw. niedrigeren Energiezustand,  $k_B$ : Boltzmann-Konstante). Quanten einer eingestrahlten elektromagnetischen Welle, deren Energie dem Unterschied  $\Delta E = \gamma\hbar B$  entspricht, induzieren einen Übergang von  $^{31}\text{P}$ -Kernen vom niedrigen ins hohe Energieniveau. Aus einem breiten Frequenzspektrum eingestrahlter elektromagnetischer Wellen wird die Frequenz absorbiert, deren Energie dem Unterschied  $\Delta E$  der beiden Zustände entspricht. Diese Frequenz wird auch als Resonanzfrequenz bezeichnet. Im aufgenommenen Spektrum ist an dieser Stelle ein deutliches Absorptionssignal zu erkennen.

Am Phosphorkern selbst liegt jedoch nicht genau das externe Magnetfeld  $B$  vor, sondern ein durch die Umgebung leicht verändertes Magnetfeld  $B + \Delta B$ . Durch diese Veränderung in  $B$  ändert sich der Energieunterschied  $\Delta E$  und damit die Resonanzfrequenz. Die Verschiebung in der Resonanzfrequenz im Vergleich zu einem externen Standard (hier:  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) wird *chemische Verschiebung*  $\delta$  genannt. Anhand der chemischen Verschiebung lassen sich Aussagen über die unmittelbare chemische Umgebung des Phosphorkerns treffen. Die chemische Verschiebung setzt sich aus den in Kapitel 3.3.5 angegebenen Beiträgen zusammen, die für eine Veränderung der Elektronendichte am Kern sorgen. Ist die Elektronendichte am Kern größer als beim externen Standard, spricht man von Abschirmung und es findet eine Verschiebung zu kleinen  $\delta$  statt (Hochfeldverschiebung). Ist die Elektronendichte am Kern klein, findet eine Entschirmung des Kerns und eine Verschiebung zu großen  $\delta$  statt (Tiefeldverschiebung).

Ein weiterer charakteristischer Parameter des NMR-Spektrums ist die Halbwertsbreite  $\nu_{1/2}$ . Sie verhält sich reziprok zur Relaxationszeit der P-Kerne, d.h. der mittleren Zeit, die die Kerne benötigen, um aus dem angeregten Zustand durch spontane Emission von Quanten in den niedrigeren Grundzustand überzugehen. Eine kurze Relaxationszeit weisen Kerne auf, die ihre Energie leicht an die Umgebung abgeben können. Das sind Kerne, die relativ stark – z.B. in ein Gitter – gebunden und immobilisiert vorliegen. Die Halbwertsbreite solcher Kerne ist groß. Umgekehrt liegt eine kleine Halbwertsbreite vor, wenn die Kerne längere Zeiten auf dem höheren Energieniveau verbleiben, was für ungebundene P-Kerne der Fall ist. In allen aufgenommenen Spektren der IML wurde nur ein einzelnes Signal, hervorgerufen durch das P-Atom aus der Phosphatgruppe des

Lecithins, beobachtet. Ein Aufsplitten des P-NMR-Signals für inverse Lecithin-IML ist in der Literatur nicht erwähnt. Durch Arzneistoffsolubilisierung verursachte zu erwartende Signalaufsplittings konnten mit den Messungen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da sie – falls vorhanden – sehr klein gegen die große Halbwertsbreite der Signalpeaks sind. Ein typisches  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ist in Abb. 3.2 zu sehen.

Es wurden zwei Studien mittels NMR durchgeführt. In der ersten wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Timolol-Hydrogenmaleat und Wasser auf die Standard-IML untersucht; die zweite Studie beschäftigte sich mit den Unterschieden im Einbau verschiedener Arzneistoffmoleküle. Des Weiteren wurde ein Vergleich von Lecithinmonomeren in Methanol mit Lecithin in IPM – wo es in inversen Mizellen assoziiert vorliegt – durchgeführt. Für diesen Vergleich wurde die Locksubstanz  $\text{D}_2\text{O}$  gegen Methanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ausgetauscht. Die chemische Verschiebung beträgt bei den inversen Mizellen  $\delta = -1.1 \pm 0.4$  ppm gegenüber den Monomeren in Methanol. Die Halbwertsbreite nimmt von  $\nu_{1/2} = 0.15$  ppm beim monomeren Lecithin auf  $\nu_{1/2} = 1.2$  ppm beim mizellar assoziierten Lecithin zu. Die polare Umgebung des P-Kerns der Monomere im Methanol sorgt für einen Abzug der Elektronen vom Phosphorkern. Der Elektronenabzug wird noch verstärkt, wenn die TMA-Gruppe mit der Phosphatgruppe wechselwirkt, wie es von Grdadolnik et al. für Lecithin in wasserfreiem  $\text{CCl}_4$  beschrieben wurde [134]. In der IML liegt das Lecithin assoziiert vor. Da das System nicht vollständig wasserfrei ist, sondern einen Restwassergehalt von  $c_{aq} \approx 0.7\%$  aufweist ( $w_0 = 1$ ), liegt nach Capitani et al. die O–C–C–N-Kette des Lecithins bereits größtenteils in der gestreckten trans-Konformation vor [80]. Die Wechselwirkung zwischen der TMA-Gruppe und der Phosphatgruppe des Lecithins wird stark abgeschwächt und es werden weniger Elektronen vom P-Kern abgezogen. Die Folge ist die beobachtete Hochfeldverschiebung. Die Erhöhung der Halbwertsbreite ist wegen der verstärkten Wechselwirkung der assoziierten Lecithinmoleküle in den Mizellen erklärbar.

Abb. 5.46 zeigt den Einfluss von Timolol-Hydrogenmaleat und Wasser auf den Phosphorkern des Lecithins. Mit jeder Messreihe wurden zwei wasserarme Standard-IML als Vergleichsproben gemessen. Die mittlere chemische Verschiebung der Vergleichsproben wurde für alle Messungen  $\delta = 0.0$  ppm gesetzt, um mögliche Fehlerquellen durch Veränderungen im Lecithin (Chargenwechsel, Alterung) zu minimieren. Alle weiteren Proben wurden ebenfalls mindestens in zweifacher Ausfertigung vermessen; ist nur ein Punkt im Diagramm zu sehen, weisen beide Proben exakt dieselben Werte auf. Aus den Messungen ist ersichtlich, dass **Wasser** eine Entschirmung des Kerns bei gleichzeitiger Immobilisierung der Phosphatgruppe bewirkt. Der Effekt des Wassers ist leicht zu interpretieren: durch die Hydratisierung der Phosphatgruppe entzieht das sehr polare Wasser dem P-Kern Elektronen und sorgt somit für eine Tieffeldverschiebung. Die

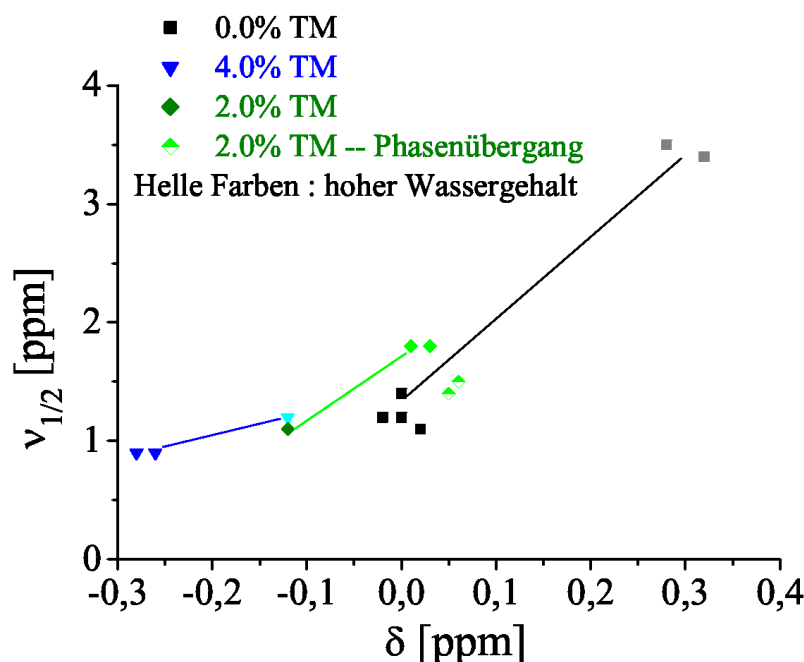


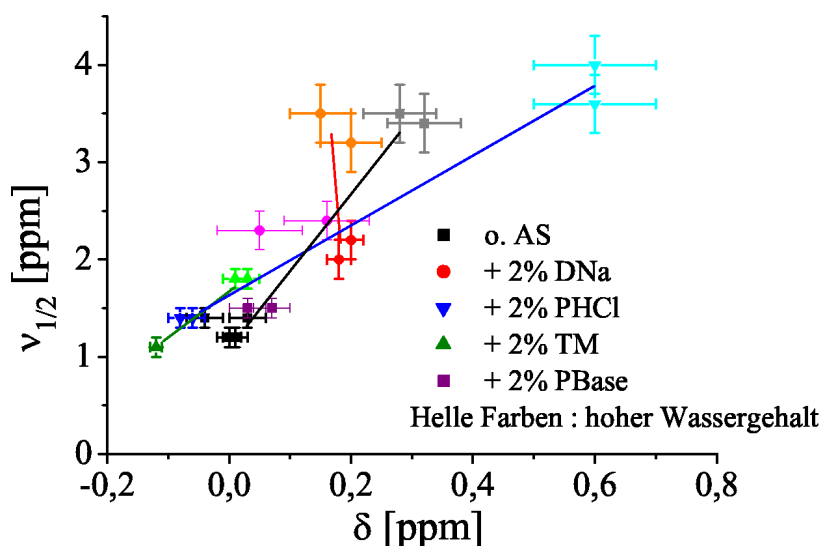
Abbildung 5.46: Chemische Verschiebung  $\delta$  und Halbwertsbreite  $\nu_{1/2}$  von Standard-IML unter Einfluss von Timolol-Hydrogenmaleat und Wasser.

Immobilisierung der Phosphatgruppe ist durch die Assoziation zu Spaghettimizellen und die damit verbundene Erhöhung der Viskosität zu erklären. Nach dem Phasenübergang in ein lamellares System nehmen die Viskosität und ebenso die Halbwertsbreite wieder ab. Capitani et al. zeigten, dass die Halbwertsbreite der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale dem Verlauf der Viskosität folgt [80].

**Timolol-Hydrogenmaleat** weist einen zum Wasser gegenteiligen Effekt auf. Die Hochfeldverschiebung durch die Wechselwirkung mit TM deutet auf eine weniger polare Umgebung des P-Kerns im Vergleich zu den arzneistofffreien inversen Mizellen hin. Da eine elektrostatische Wechselwirkung des Timolols mit der Phosphatgruppe eine Tief-feldverschiebung zur Folge hätte, spricht vieles für Wechselwirkungen über H-Brücken, wie sie von Lindell et al. für zwitterionische Phospholipide angenommen werden [183]. Durch den Einbau von TM kommt es zudem zu einem größeren Zwischenraum zwischen den Lecithin-Molekülen, in den Moleküle des unpolaren Lösungsmittels unter Erhöhung des Packungsparameters eindringen können. Folge ist eine Abschirmung des P-Kerns nebst Hochfeldverschiebung. Die Abnahme der Halbwertsbreite erfolgt wegen der erhöhten Mobilität des Lecithins in kleineren Mizellassoziaten, die bei der Solubilisierung von TM entstehen. Betrachtet man das TM als Sollbruchstelle im dynamischen *break*

*and recombine*-Prozess der Spaghettimizellen, so lassen sich zwei Erklärungsansätze für die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Ergebnisse aufstellen. Durch das häufigere Auseinanderbrechen der Spaghettimizellen in Gegenwart von TM gerade bei hohen Wasseranteilen wird (a) die Beweglichkeit der Lecithinmoleküle höher und damit die Halbwertsbreite niedriger, und (b) kann sich Lecithin beim Auseinanderbrechen der Mizellen häufiger im direkten Kontakt mit dem lipophilen Lösungsmittel befinden, woraus letztlich eine Hochfeldverschiebung resultiert.

Die Wechselwirkungen der Standard-IML mit den anderen Modellarzneistoffen sorgt für die in Grafik 5.47 abgebildeten Signalveränderungen.



und TMA-Gruppe eine Hochfeldverschiebung bewirkt, andererseits werden (b) die Phosphatgruppen durch das Wasser entschirmt, was eine Tieffeldverschiebung zur Folge hat. Als Resultat kommt es zu keiner weiteren Signalverschiebung, sondern nur zu einer Vergrößerung der Halbwertsbreite.

**Pilocarpin-HCl** sorgt für eine laterale Aufweitung der Spaghettimizellen. Durch diese Aufweitung können Moleküle des unpolaren Lösungsmittels in den Zwischenraum zwischen zwei Lecithinmoleküle eindringen. In diesem Fall konkurrieren die Hochfeldverschiebung, verursacht einerseits durch die Entfaltung der O–C–N-Kette durch das PHCl und andererseits durch das Eindringen von Lösungsmittelmolekülen in die Zwischenräume mit einer Tieffeldverschiebung induziert durch die Wechselwirkung des Pilocarpin-Kations mit der Phosphatgruppe. Als Resultat bleibt eine nur schwach ausgeprägte Hochfeldverschiebung. Durch ein Hinzufügen von Wasser werden die durch das Pilocarpin geschaffenen Zwischenräume im polaren Kern ausgefüllt. Das extrem polare Wasser kann die Phosphatgruppen ungehindert erreichen und verursacht eine vergleichsweise große Tieffeldverschiebung.

**Pilocarpin-Base** zeigt als weniger hydrophiles Molekül (löslich auch in organischen Lösungsmitteln) im Gegensatz zum PHCl überhaupt keine Signalverschiebungen. Nur die Halbwertsbreite wird durch Wasserzusatz leicht erhöht. Da Pilocarpin-Base auch die SAXS-Streukurven nicht beeinflusste, liegt die Vermutung nahe, dass der Arzneistoff nicht solubilisiert wird. Dagegen spricht, dass bei Wasseraufnahme eine vergleichsweise geringe Verschiebung sowie geringe Erhöhung der Halbwertsbreite auftritt. Die Wechselwirkung der Standard-IML mit Pilocarpin-Base, die im Rahmen dieser Messungen nicht geklärt werden konnte, beeinflusst offenbar die Wasseraufnahme. Wesentlich ist, dass wie schon bei den SAXS-Messungen die Pilocarpin-Base einen völlig anderen Effekt auf die Mizellen hat als das PHCl.

Wie aus obiger Darstellung ersichtlich, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die aufgetretenen Signalverschiebungen. Um die Wechselwirkungen verschiedener funktioneller Gruppen selektiv betrachten zu können, wurden im Folgenden FTIR-Messungen durchgeführt.

#### 5.4.2 Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Mit der Infrarot-Strahlung ist es möglich, die im Lecithinmolekül gebundenen Atome zu Schwingungen anzuregen. Bei Einstrahlung eines kontinuierlichen Spektrums von IR-Strahlung werden diejenigen Frequenzen von der Probe absorbiert, die den Eigenfrequen-



zen molekularer Bindungen der Probe entsprechen. Anhand der so entstehenden Absorptionsbanden können Moleküle identifiziert werden. In dieser Studie geht es jedoch darum, Änderungen in der lokalen Umgebung der funktionellen Gruppen des Lecithins zu messen und zu quantifizieren. Änderungen können z.B. Konformationsänderungen oder H-Brückenbindungen sein, die für diese Arbeit besonders interessant ist. So ist bekannt, dass H-Brückenbindungen an funktionellen Gruppen eine Verschiebung der entsprechenden Absorptionsbande zu kleineren Wellenzahlen verursachen [133]. Die Standard-IML lässt sich jedoch nicht mit FTIR charakterisieren, da das IPM durch seine Estergruppe eine sehr hohe Eigenabsorption im Fingerprintbereich aufweist, die das Phospholipidspektrum überdeckt. Abhilfe konnte durch einen Ersatz des Lösungsmittels IPM durch Dekan geschaffen werden (s. Kapitel 3.3.5). Die Verschiebungen wurden qualitativ ausgewertet, da quantitative Interpretationen nicht auf die IPM-haltigen Systeme übertragbar sind. Zwei Messreihen wurden durchgeführt:

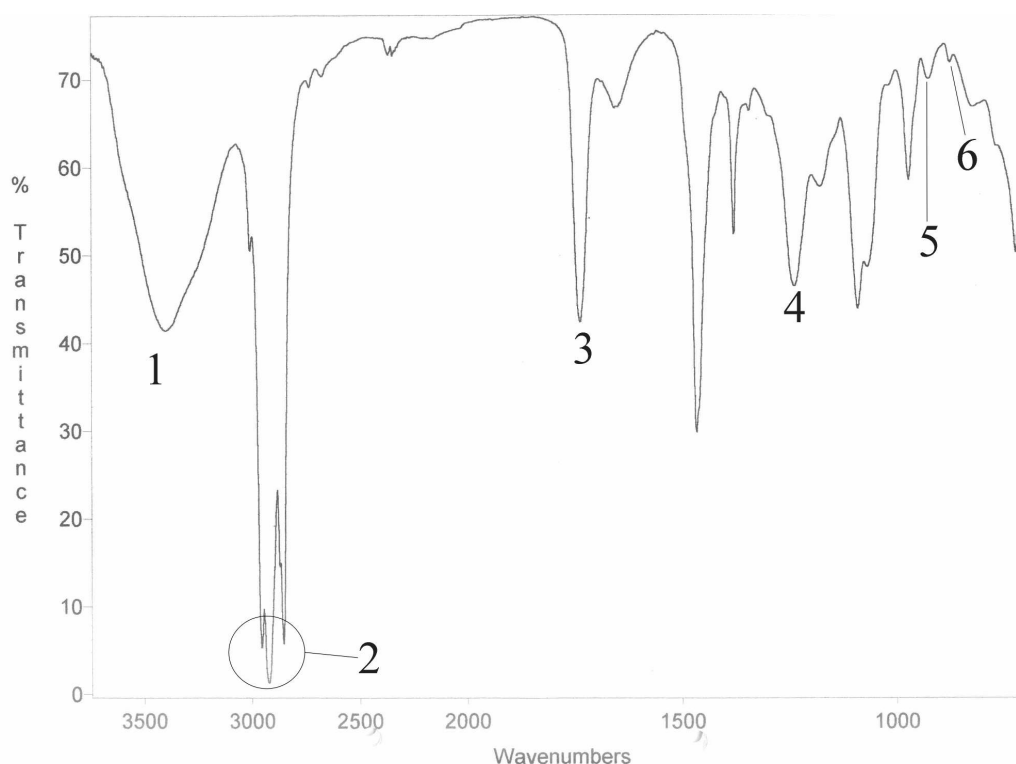


Abbildung 5.48: IR-Spektrum einer invers mizellaren Lösung von Lecithin in Dekan. Ausgewertet wurden die Absorptionsmaxima der  $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung (3), der  $\nu_{\text{as}}(\text{OPO})$ -Schwingung (4), der  $\nu_{\text{s}}(\text{N-CH}_3)$ -Schwingung der O-C-C-N-trans-Konformation (5) und der  $\nu_{\text{s}}(\text{N-CH}_3)$ -Schwingung der O-C-C-N-gauche-Konformation (6). Die  $\nu(\text{OH})$ -Schwingung (1) gibt Aufschluss über den Bindungszustand des gebundenen Wassers, (2) zeigt die Absorptionsmaxima der Kohlenwasserstoffketten. (1) und (2) wurden nicht weiter untersucht.

1. Arzneistofffreie Systeme und Systeme mit 2% Diclofenac-Na wurden jeweils zweifach bei verschiedenen Wassergehalten zwischen  $c_{\text{aq}} = 0.5\% - 5.5\%$  untersucht, al-

so auch Systeme jenseits des durch den Zusatz von Wasser induzierten Phasenübergang in eine lamellare Mesophase. Bei der Herstellung der Proben trat das Problem auf, dass neben Wasser auch Dekan in nicht unerheblicher Menge evaporisierte. Eine komplette Verifikation des Herstellungsprozesses mittels Differenzwägung während der Messungen ergab, dass sich das Lecithin-Dekan-Verhältnis von anfangs 30:70 auf 45:55 änderte. Durch eine Vergleichsstudie jeweils dreier Systeme mit 30% und 50% Lecithin konnte gezeigt werden, dass sich die relevanten Absorptionsbanden des Phospholipids in ihrer Wellenzahl nicht signifikant in Abhängigkeit von der Konzentration änderten.

2. Die Systeme wurden mit Arzneistoffen in Konzentrationen von 2%-10% (DNa) bzw. 1%-5% (TM und PHCl) beladen. Dies gelang beim PHCl nicht problemlos, da es über die wässrige Stammlösung eingefügt werden musste. Bei Evaporisation des Wassers verdampfte auch Dekan, was bei den hochkonzentrierten Systemen zu einem Phasenübergang in ein wachsartiges System führte, wie es bei dem System mit 5% PHCl beobachtet wurde. Die Systeme mit 3% und 4% PHCl wiesen nach der Herstellung einen noch sehr hohen Restwassergehalt auf und hätten zur Auswertung um den Einfluss des Wassers korrigiert werden müssen, was bei Auftreten von synergistischen oder antagonistischen Effekten bei der gleichzeitigen Solubilisation von PHCl und Wasser zu Fehlern geführt hätte. Es wurden deshalb nur die Proben mit 1% und 2% PHCl ausgewertet.

Eine komplette Zuordnung der Schwingungen eines Phospholipidmoleküls zu entsprechenden Wellenzahlen ist bei Fringeli und Günthard zu finden [132]. Anhand dieser Tabelle wurde das IR-Spektrum einer aus Lecithin und Dekan bestehenden IML entschlüsselt. Abbildung 5.48 zeigt das komplette IR-Spektrum einer IML mit den zugeordneten Schwingungen. Aufgeführt wurden nur die Absorptionsbanden, die auch später ausgewertet wurden. In den Abb. 5.49–5.52 sind die gemessenen Verschiebungen aufgeführt.

Aus den linken Abbildungen ist zu erkennen, dass die Messungen erstens im Rahmen der Messgenauigkeit reproduzierbar sind und zweitens die gleichzeitige Solubilisation von Diclofenac-Na und Wasser weder synergistische noch antagonistische Effekte aufweist. Die Anwesenheit des Diclofenac-Na beeinflusst offenbar die Hydratation des Lecithins überhaupt nicht. Einen Hinweis auf andere Bindungszustände des Wassers könnte eine quantitative Analyse des  $\nu(\text{OH})$ -Absorptionssignals geben. Eine solche Analyse wurde von Maitra et al. an verschiedenen Lecithin-IML durchgeführt (s. Kap. 2.2.5) [77]. Des weiteren ist der Phasenübergang von der IML in die lamellare Mesophase an den Verschiebungen nicht zu erkennen. Die Hydratation ist ein kontinuierlicher Prozess, der die Lecithin-Moleküle – wahrscheinlich hinsichtlich des Packungsparameters – dahingehend verändert, dass ab einem definierten  $w_0$  ein Phasenübergang in die Mesophase stattfindet.

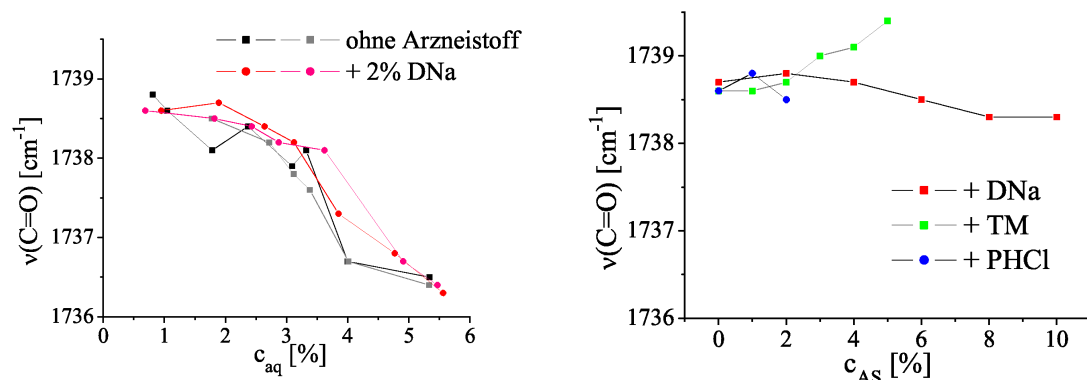


Abbildung 5.49: Verschiebung der  $\nu(\text{C=O})$ -Schwingung durch den Einfluss von Wasser (links) und verschiedener Arzneistoffe (rechts).

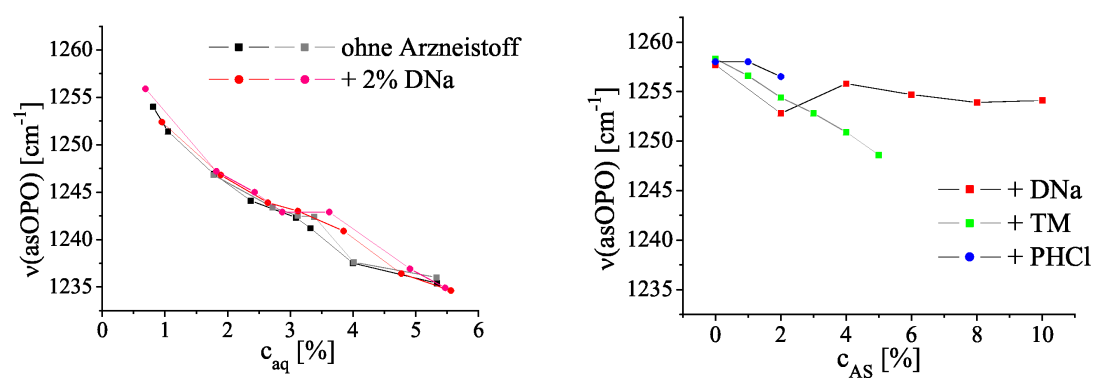


Abbildung 5.50: Verschiebung der  $\nu_{\text{as}}(\text{OPO})$ -Schwingung durch den Einfluss von Wasser (links) und verschiedener Arzneistoffe (rechts).

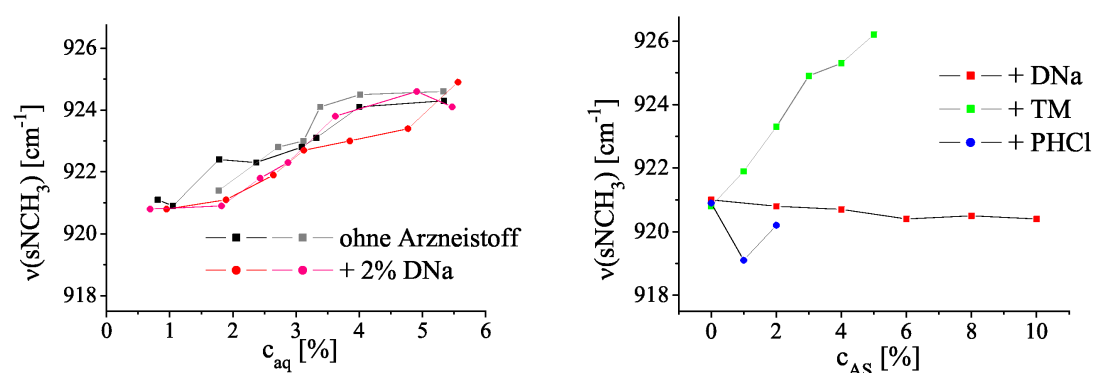


Abbildung 5.51: Verschiebung der  $\nu_{\text{s}}(\text{N-CH}_3)$ -Schwingung der O–C–C–N-trans-Konformation durch den Einfluss von Wasser (links) und verschiedener Arzneistoffe (rechts).

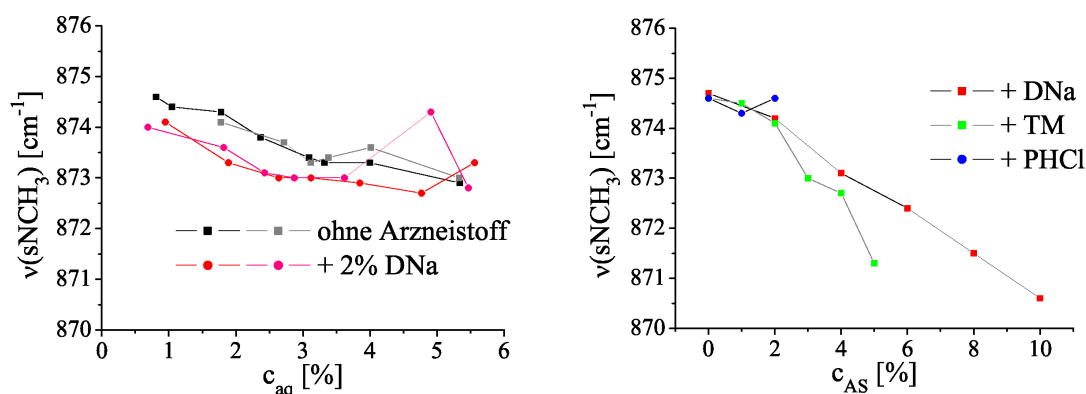


Abbildung 5.52: Verschiebung der  $\nu_s(\text{N-CH}_3)$ -Schwingung der O-C-C-N-gauche-Konformation durch den Einfluss von Wasser (links) und verschiedener Arzneistoffe (rechts).

FTIR-Messungen der Wechselwirkungen zwischen einer Lecithin-IML und **Wasser** sind mehrfach in der Literatur erwähnt [77, 83, 84, 134]. Eine umfangreiche FTIR-Studie zum Einfluss von Wasser auf eine Lecithin/*n*-Dekan-IML wurde von Shumilina et al. durchgeführt [84]. Die dort zu findenden Ergebnisse dienen als Vergleichsresultate für die Messungen dieser Arbeit und konnten sämtlich qualitativ reproduziert werden. Die Interpretationen der Verschiebungen aus [84] stimmen mit den bisherigen Erkenntnissen dieser Arbeit überein. So ist die bathochrome Verschiebung der  $\nu_{\text{as}}(\text{OPO})$ -Bande einer H-Brückenbindung an die Phosphatgruppe zuzuordnen. Diese H-Brücken mit Wassermolekülen verbinden benachbarte Lecithin-Moleküle und sorgen für ein Wachstum zu Spaghettimizellen. Die Hydratation der Phosphatgruppe verläuft kontinuierlich. Eine abgeschlossene Hydratation wie von Shervani et al. [83] beobachtet wurde konnte nicht festgestellt werden (Abb. 5.50). Eine bathochrome Verschiebung wurde auch für die Carbonylgruppe festgestellt (Abb. 5.49), die aber erst bei mittleren Wassergehalten besonders deutlich ausfällt. Das Wasser wird demzufolge erst nach erfolgter Hydratation der Phosphatgruppe an die Carbonylgruppe angelagert. Die hypsochrome Verschiebung der der trans-Konformation der O-C-C-N-Kette zugeordneten Schwingung bedeutet nach Interpretation von Shumilina et al. einen Übergang von der gauche- in die trans-Konformation der Lecithin-Kopfgruppen [84]. Dass dieser Übergang kontinuierlich erfolgt, deutet darauf hin, dass nach der Konformationsänderung noch schwach ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen TMA- und Phosphatgruppe existieren, die mit fortschreitender Hydratation der Phosphatgruppe abnehmen. Fraglich bleibt, weshalb auch bei hohen Wasseranteilen noch eine der gauche-Konformation der O-C-C-N-Kette zugeordnete Absorptionsbande nachweisbar ist. Es ist jedoch zu diskutieren, ob es in den inversen Mizellen im Gleichgewicht Moleküle gibt, deren Kopfgruppen trotz Hydratation in der gauche-Konformation vorliegen, was z.B. bei den im Vergleich zur gestreckten Mizelle anders strukturierten *end caps* der Fall sein könnte.

Die Zugabe von **Diclofenac-Na** induziert nur in der Bande der TMA-gauche-Konformation eine deutliche bathochrome Verschiebung (Abb. 5.52). Das aus den SAXS-Resultaten postulierte Modell geht von einer Wechselwirkung des Diclofenac-Anions mit der TMA-Gruppe aus. Die lipophilen Bereiche des amphiphilen Diclofenac-Moleküls orientieren sich jedoch entsprechend ihrer Affinität in den lipophilen Randbereich der Mizelle. Die TMA-Gruppe des Lecithins wird dabei in der gauche-Konformation „festgehalten“, wodurch die bathochrome Verschiebung der zugehörigen Absorptionsbande verursacht wird [84]. Andererseits verschiebt die Hydratation die Bande der trans-Konformation wie bei den arzneistofffreien Systemen hypsochrom, was für eine Entfaltung der O–C–N-Kette spricht. Die Wirkungen von Wasser und DNa auf die Konformation stehen sich konkurrierend gegenüber, da bei einer Beladung mit 2% DNa nur auf jedes sechste Lecithin- ein DNa-Molekül kommt. Es sind deshalb jeweils nur einige Lecithinmoleküle von einer Wechselwirkung mit DNa betroffen.

Eine Solubilisation von **Timolol-Hydrogenmaleat** beeinflusst alle untersuchten Banden. Die bathochrome Verschiebung der  $\nu_{as}(\text{OPO})$ -Schwingung weist eine Bindung an die Phosphatgruppe nach, die aller Voraussicht nach durch Wasserstoffbrücken mit dem Timolol-Kation verursacht wird. Shchipunov et al. wiesen einen bathochromen Shift bei einer Solubilisation von Alkylglykosiden in inverse Lecithin/Dekan-Systeme nach, den sie ebenfalls mit H-Brückenbindungen zwischen Lecithin und dem Fremdstoff erklärten [81]. Gegensätzliche Effekte weisen die beiden Banden der TMA-Gruppe auf, was auf konträre Wirkungen hindeutet. Ein Erklärungsansatz nach Akutsu und Nagamori ist, dass durch den Einbau eines Kations wie Timolol eine Konformationsänderung von gauche nach trans stattfindet [191]. Dieser Effekt des Timolol-Kations konnte anhand einer hypsochromen Verschiebung der Bande der trans-Konformation nachgewiesen werden. Bei Hinzufügen von Wasser zu arzneistofffreien Systemen trat derselbe Effekt auf. Die bathochrome Verschiebung der zur gauche-Konformation zugeordneten Bande ist durch eine Wechselwirkung zwischen der positiven TMA-Gruppe und dem Maleat-Anion erklärbar. Das Maleat-Anion zeigt damit einen ähnlichen Einfluss wie das Diclofenac-Anion. Die leichte hypsochrome Verschiebung der Bande der Carbonylgruppe könnte durch eine Abschirmung der C=O-Gruppen durch das voluminöse Timolol-Kation verursacht werden.

Für die Messreihe mit **Pilocarpin-HCl** standen aus den oben genannten Gründen nur die Proben mit 1% bzw. 2% Arzneistoff zur Verfügung. Die mit IR-Spektroskopie gemessenen Verschiebungen (Abb. 5.49–5.52) weisen keine interpretierbaren Tendenzen auf. Für die Postulierung der Modelle zur Wechselwirkung zwischen Lecithin und PHCl können

die Resultate aus der FTIR-Spektroskopie deshalb nicht berücksichtigt werden.

# Kapitel 6

## Modellvorschläge und Abschlussdiskussion

Die aus den Experimenten gewonnenen Erkenntnisse geben Anhaltspunkte zur Postulierung von Modellen zur Wechselwirkung zwischen Lecithin und solubilisierten Fremdstoffen wie den Modellarzneistoffen und Wasser. Die Modelle zeigen den wahrscheinlichsten Mizellaufbau. Weiterhin werden Wechselwirkungen zwischen den Lecithinmolekülen untereinander sowie zwischen Molekülen von Lecithin und IPM diskutiert. Die Modellvorschläge sind Gegenstand dieses Kapitels, das gleichzeitig eine Abschlussdiskussion dieser Arbeit darstellt.

### 6.1 Molecular Modelling

Mit dem in *Kapitel 3.3.7* beschriebenen Verfahren des Molecular Modellings können die an den Wechselwirkungen beteiligten Moleküle in ihrer räumlichen Orientierung dargestellt werden. Die Modelle sind in den Abbildungen 6.1–6.5 zusammen mit schematischen Modellen dargestellt. Mit Hilfe der vereinfachten, schematischen Modelle werden die Modellvorschläge der Wechselwirkungen diskutiert.

Zur Berechnung der Raumstruktur des Phosphatidylcholins wurde für beide Fettsäurereste Linolsäure ( $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$ ) eingesetzt. Die Energieminimierungsroutine wurde der Einfachheit halber unter Annahme eines isolierten Moleküls in der Gasphase durchgeführt. Dieses Modell trifft auf assoziierte Lecithinmoleküle in lipophilen Lösungsmitteln sicher nicht zu. Aus diesem Grund wurde eine Anfangsbedingung gewählt, mit der ein Molekül mit gestreckter Raumstruktur optimiert werden konnte. Die Länge des ausgestreckten Lecithinmoleküls beträgt etwa  $l_c = 3.0$  nm, während der polare Teil im gestreckten Zustand etwa  $l_{pol} = 1.05$  nm misst.

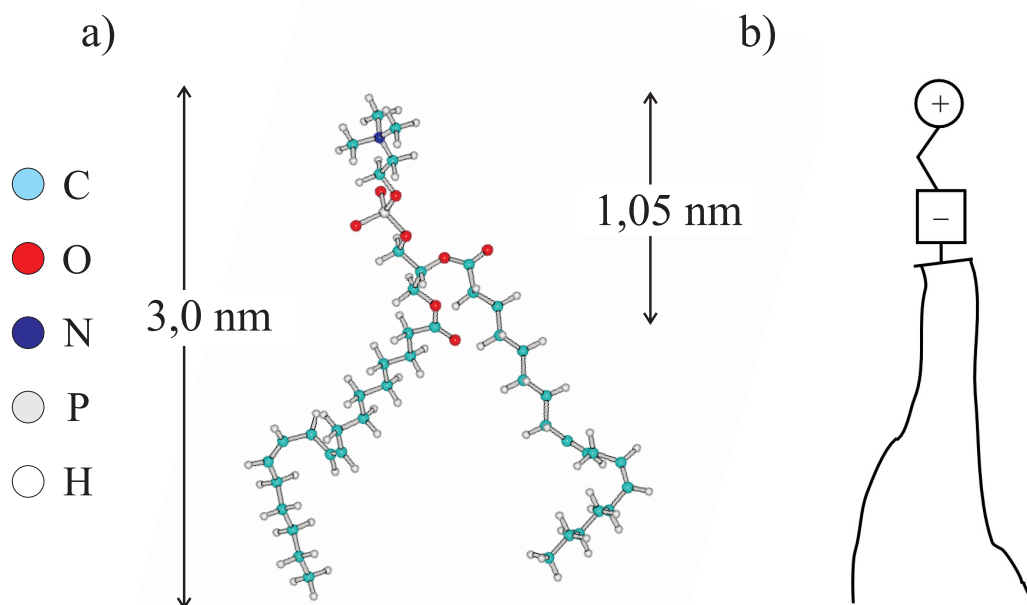


Abbildung 6.1: Energieminimierte, gestreckte Raumstruktur des Phosphatidylcholins. (a) Modell aus dem Molecular Modelling. (b) Schematisches, vereinfachtes Modell.

## 6.2 Modelle zur Assoziation der Lecithinmoleküle

Das isoliert betrachtete Phospholipidmolekül weist einen Packungsparameter von  $P = 0.8 - 1.0$  auf [198], was besagt, dass die Ausbildung lamellarer Phasen bevorzugt stattfindet (Abb. 6.2a). In einem lipophilen Lösungsmittel hingegen können Lösungsmittelmoleküle in die Region der Fettsäurereste des Lecithins eindringen [199, 200] und damit den Packungsparameter dahin vergrößern, dass eine spontane Assoziation zu inversen Mizellen stattfindet (Abb. 6.2b). Durch die FTIR-Messungen konnte gezeigt werden, dass die ersten solubilisierten Wassermoleküle die Phosphatgruppe des Lecithins hydratisieren. Mit diesen Messungen konnten Erkenntnisse verschiedener Arbeitsgruppen bestätigt werden [83, 84, 134]. Gleichzeitig mit der Hydratation der Phosphatgruppe nimmt die Wechselwirkung zwischen Phosphat- und TMA-Gruppe ab und es kommt zu einer Entfaltung der O–C–C–N-Kette, die mit einem Übergang von der senkrecht zur Molekülachse angeordneten gauche-Konformation in die parallel



zur Molekülachse orientierte trans-Konformation einhergeht [80]. Die Hydratisierung der Phosphatgruppe und ihre Folgen haben nun zweierlei Auswirkungen. Erstens wird durch die Hydratation das geometrische Modell des hydratisierten Lecithinmoleküls dahingehend geändert, dass eine Assoziation zu zylindrischen Mizellen eingeleitet wird. Das entsprechende geometrische Modell entspricht einer Keilform (Abb. 6.2c). Zweitens findet durch H-Brücken zwischen den Phosphatgruppen benachbarter Lecithinmoleküle eine Assoziation zu langen, zylindrischen Aggregaten statt (Abb. 2.14) [81, 84, 85]. Es gilt dabei allgemein als gesichert, dass das Wachstum zu Spaghettimizellen durch die Hydratisierung der Phosphatgruppen induziert wird.

Aus den FTIR- und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Resultaten kann entnommen werden, dass mit zunehmendem Wassergehalt primär die Phosphatgruppe hydratisiert wird. Daneben findet eine Hydratisierung aller anderen funktionellen Gruppen des polaren Kopfbereichs in geringerem Umfang statt. Der Kopfbereich vergrößert sich relativ zum lipophilen Rest, was eine Änderung der Molekülgeometrie zur Folge hat (Abb. 6.2d). Das durch die H-Brücken induzierte Wachstum zu Spaghettimizellen zwingt dabei die Moleküle in die in Abb. 6.2d abgebildete Keilform. Durch die Entfaltung der O–C–N-Kette und die Anlagerung von Wasser in den polaren Bereich kommt es zur Zunahme des Durchmessers des Querschnitts der inversen Mizellen, die ebenfalls mit SAXS nachgewiesen wurde. Durch einen Vergleich der Ausdehnung des mizellaren Querschnitts mit den Ausdehnungen der Kopfgruppe des Lecithins sowie durch die nur geringe Zunahme des Durchmessers des mizellaren Querschnitts kann die Existenz von Bulkwasser ausgeschlossen werden. Das in der Literatur mehrfach erwähnte Anwachsen inverser Lecithinmizellen zu Spaghettimizellen in apolaren Lösungsmitteln konnte mit den SAXS- und PCS-Messungen in dieser Arbeit bestätigt werden.

Es können jedoch nicht alle Lecithinmoleküle dieselben geometrischen Ausmaße haben. Die inversen Mizellen, die lt. SAXS-Resultaten eine vom Wassergehalt abhängige Länge haben, weisen zur Minimierung der Grenzflächenenergie an den Enden globuläre Kappen, sog. *end caps* auf [81, 87, 93]. Die Ausbildung dieser *end caps* ist wegen der geometrischen Form der Moleküle als ungünstig anzusehen, so dass die freie Bildungsenergie zur Ausbildung der Enden größer als die zur Verlängerung der Assoziate zu Spaghettimizellen nötige freie Bildungsenergie ist. Auf die Berechnungen dieser Energiedifferenzen soll in dieser Arbeit nicht eingegangen werden, sie hängen jedoch maßgeblich von der Molekülgeometrie ab. Die Länge der Mizellen wird deshalb als primär abhängig von dieser Energiedifferenz betrachtet, die mit zunehmendem Wassergehalt aufgrund der für globuläre *end caps* ungünstigeren Geometrie zunimmt [81]. Daher ist davon auszugehen, dass an den mizellaren Enden Lecithinmoleküle vorliegen, die eine von den anderen Molekülen verschiedene Geometrie aufweisen, wofür Erkenntnisse

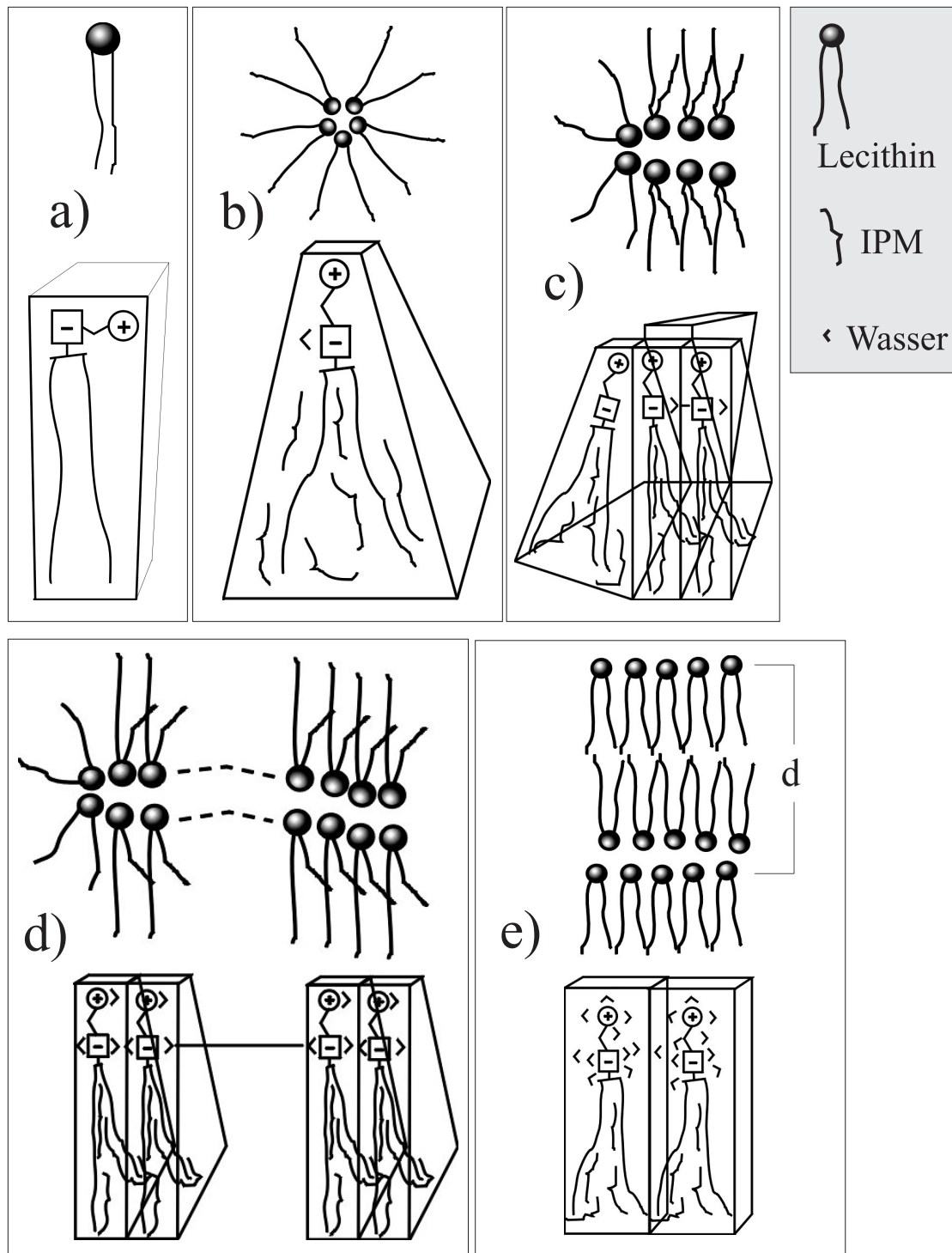


Abbildung 6.2: Modellvorschläge. (a) isoliertes Lecithinmolekül, (b) Bildung inverser Mizellen, (c,d) Wachstum zu Spaghettimizellen durch Hydratisierung, (e) Assoziation zu multilamellaren Bereichen. In den jeweils oberen Schemata sind Wasser- und IPM-Moleküle der besseren Übersichtlichkeit halber fortgelassen worden.

aus der IR-Spektroskopie sprechen, die das gleichzeitige Auftreten von Molekülen unterschiedlicher Konformationen in einer IML zeigen. Untermuert wird diese Theorie durch Resultate aus dem Molecular Modelling, die unter leicht veränderten Anfangsbedingungen teilweise starke Unterschiede in der Molekülkonfiguration zur Folge haben.

Bei fortschreitender Hydratisierung findet ein Phasenübergang in eine Phase mit multilamellaren Vesikeln statt. Kurz unterhalb des Phasenübergangs ist nach Shchipunov und Hoffmann eine Verzweigung der Spaghettimizellen nachzuweisen [94]. Dieses inzwischen von weiteren Autoren unterstützte Modell fußt auf Wasserstoffbrücken zwischen mehreren Wasser- bzw. Fremdmolekülen und Lecithin (s. Abb. 2.14). Eine weitere Erklärung für das Auftreten von Verzweigungen wird von Appell et al. für wässrige Systeme gegeben [87], lässt sich aber auch auf inverse Spaghettimizellen übertragen [81]. Appell et al. diskutieren eine Verhinderung energetisch ungünstiger *end caps* durch Verzweigungen; andererseits setzen Verzweigungspunkte eine negative Krümmung voraus, die im Fall der inversen Mizellen bei starker Hydratisierung der polaren Kopfgruppe durchaus auftreten kann. Im Bereich des Phasenübergangs sind Übergangsstrukturen zu finden [185], die evtl. durch Umorientierungen sowohl innerhalb der Moleküle als auch innerhalb der Assoziante zu erklären sind. In einem lyotropen Übergangsbereich eines Lecithin/Cyclohexan/Wasser-Systems identifizierten Angelico et al. eine nematische Phase durch Parallel-Anordnung zylindrischer Mizellen [202].

Die jenseits des Phasenübergangs auftretenden multilamellaren Bereiche sind aus Lecithinmolekülen zusammengesetzt, die einen Packungsparameter von  $P \approx 1$  aufweisen, also etwa eine zylindrische Form haben (Abb. 6.2e). Bis zu 35 Wassermoleküle können die polare Kopfgruppe in mehreren Lagen hydratisieren [182], wodurch der Netzebenenabstand der Lamellen von etwa  $d = 5.0$  nm auf  $d = 6.1$  nm zunimmt, wie den SAXD-Resultaten zu entnehmen ist. Die Wechselwirkungen der Lecithinmoleküle untereinander nehmen durch die Hydratationsschicht ab, bis es bei  $w_0 \approx 50$  zu einem Zusammenbruch der lamellaren Phase kommt. Die Ergebnisse aus der Röntgenkleinwinkelbeugung zeigen eine im Vergleich zur lamellaren Phase völlig andere, wesentlich ungeordnetere Struktur bei höheren Wassergehalten. Diese Struktur weist einen hohen Netzebenenabstand von  $d = 11 - 12$  nm auf, der auch doppelt so groß sein könnte, was aber wegen der Auflösungsgrenze der Kleinwinkelkameras nicht eindeutig zu klären war. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass das Wasser nunmehr als eigene Phase in Emulsionströpfchen vorliegt. Die Strukturen sind entweder in der Grenzfläche zu finden, worauf die Texturen der polarisationsmikroskopischen Aufnahmen hinweisen, oder durch ein neben der Emulsion vorliegendes cremeähnliches System gegeben. Das Wasser liegt in diesem System als wesentlich schwächer gebundenes freies Wasser vor, weshalb es bei einer thermogravimetrischen Untersuchung sehr leicht flüchtig ist.

## 6.3 Modelle zum Einbau der Arzneistoffe

Die Veränderung von Form und Größe der inversen Mizellen durch eine Beladung mit Arzneistoffen konnte mit Lichtstreuungs- und Röntgenkleinwinkeluntersuchungen festgestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse wurden in *Kapitel 5.3.4* Modelle zur Wechselwirkung postuliert. Mit spektroskopischen Methoden, die Aufschluss über die Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen des Lecithins geben, konnten die Modelle bestätigt und verfeinert werden. Diese so erhaltenen und an dieser Stelle präsentierten Modelle entstanden durch eine Kombination der Erkenntnisse aus den Messungen dieser Arbeit und Ergebnissen und Modellen aus der Literatur. Trotz der Fülle an Erkenntnissen konnten nicht alle Fragen restlos geklärt werden, so dass Abweichungen von diesen Modellen nicht ausgeschlossen werden können.

### 6.3.1 Einbau von Diclofenac-Natrium

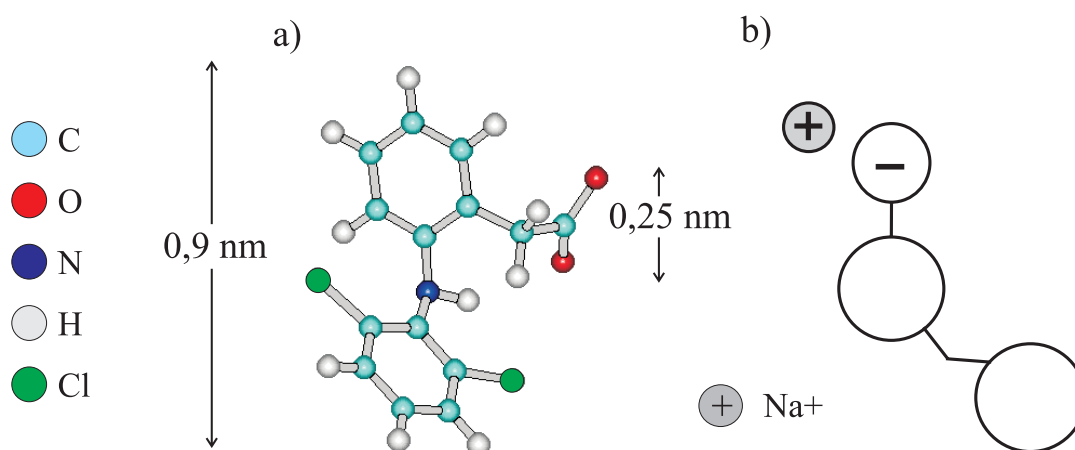


Abbildung 6.3: Energieminimierte Raumstruktur des Diclofenac-Natriums. (a) Modell aus dem Molecular Modelling. (b) Schematisches Modell.

Aus den FTIR-Resultaten ist zu schließen, dass Diclofenac-Na – vermutlich als Diclofenac-Anion – an die Trimethylammonium (TMA)-Gruppe angelagert ist. Nur die gauche-Konformation erfährt bei Beladung mit DNa eine bathochrome Verschiebung, was besagt, dass die O–C–C–N-Kette der mit DNa wechselwirkenden Lecithin-Moleküle in der gauche-Konformation vorliegt. Die lipophilen Ringgruppen des Diclofenac-Na orientieren sich zur Minimierung der Grenzflächenenergie zu den lipophilen Fettsäureresten des Lecithins. Bei diesem Vorgang bewegt sich das Molekül leicht aus dem polaren Kernbereich der Mizelle heraus nach außen und nimmt durch die elektrostatische Interaktion die TMA-Gruppe etwas mit. Aus diesem Grund kann sich die TMA-Gruppe

nach Hydratation der Phosphatgruppe nicht wie bei den unbeladenen Systemen entfalten. Bei den Systemen mit 2% DNA konnten die Auswirkungen des Arzneistoffs auf die Systeme allein mit  $^{31}\text{P}$ -NMR detektiert werden. Da die mit DNA wechselwirkenden Lecithin-Moleküle eher in der gauche-Konformation vorliegen, erfolgt wegen der größeren Nähe der Phosphat- und TMA-Gruppen (Abb. 6.4a) eine Tieffeldverschiebung, die ebenso durch eine Anlagerung des Na-Kations an die Phosphatgruppe hervorgerufen werden kann.

Durch die Wechselwirkung mit Diclofenac-Na wächst sowohl der Platzbedarf des polaren Kopfbereichs als auch der des lipophilen Bereichs an (Abb. 6.4a). Ein solches Verhalten wurde von Shinoda et al. auch für die als Kotenside bekannten kurzkettigen Alkohole im Zusammenspiel mit Lecithin postuliert [203]. Moleküle, die als Kotenside wirken, können die Aufnahme lipophiler Lösungsmittelmoleküle erleichtern und damit den Raumbedarf des lipophilen Bereichs des Lecithins vergrößern [199]. Betrachtet man die SAXS-Resultate mit 8% DNA, so ist eine Verkleinerung der Mizellen sowohl im Querschnitt als auch in der Längsausdehnung zu beobachten. Ersteres spricht für die Faltung der polaren Kopfgruppe des Lecithins, letzteres für einen größeren Packungsparameter. Die Zunahme des Packungsparameters vermindert die zur Bildung der *end caps* nötige freie Energie, was das Gleichgewicht deutlich zu kürzeren Assoziaten verschiebt. Die Ergebnisse der rheologischen Untersuchungen von Papantoniou [107] deuten ebenfalls auf eine Verkleinerung der Spaghettimizellen hin, da das Viskositätsmaximum mit zunehmendem DNA-Gehalt wesentlich schwächer ausfällt. Anzumerken ist, dass das planare Diclofenac-Na (Abb. 6.3) beim Einbau in die Spaghettimizellen theoretisch sowohl in Richtung des Querschnitts als auch in Längsrichtung orientiert sein kann (Abb. 6.4b). Wahrscheinlich ist, dass im Bereich der *end caps* eine Orientierung entlang der Mizellachse erfolgt (Abb. 6.4b links), während der Einbau in die Spaghettimizellen eine Orientierung entlang des Querschnitts favorisiert, um dem Molekülassoziat eine für das Mizellwachstum notwendige Keilform aufzuzwingen (Abb. 6.4b rechts).

Für die Wechselwirkung mit Wasser sind bei 2% Arzneistoffbeladung im Bereich der invers mizellaren Lösung mit Ausnahme der ausbleibenden Tieffeldverschiebung in der Phosphor-NMR keine signifikanten Unterschiede zu den unbeladenen Systemen festzustellen. Die ausbleibende Tieffeldverschiebung resultiert aus zwei konträren Effekten, nämlich einer Entschirmung des P-Kerns durch Hydratation und einer Abschirmung des Kerns durch die Entfaltung der O–C–C–N-Kette derjenigen Lecithin-Moleküle, die nicht mit DNA wechselwirken. Eine Beeinflussung des Wachstums zu Spaghettimizellen durch 2% Diclofenac-Na konnte nicht festgestellt werden, woraus geschlossen werden kann, dass der Ablauf der Hydratation mit dem der unbeladenen Systeme identisch ist (Abb. 6.4b). Der Phasenübergang in die lamellare Phase findet bei geringeren Wasserge-

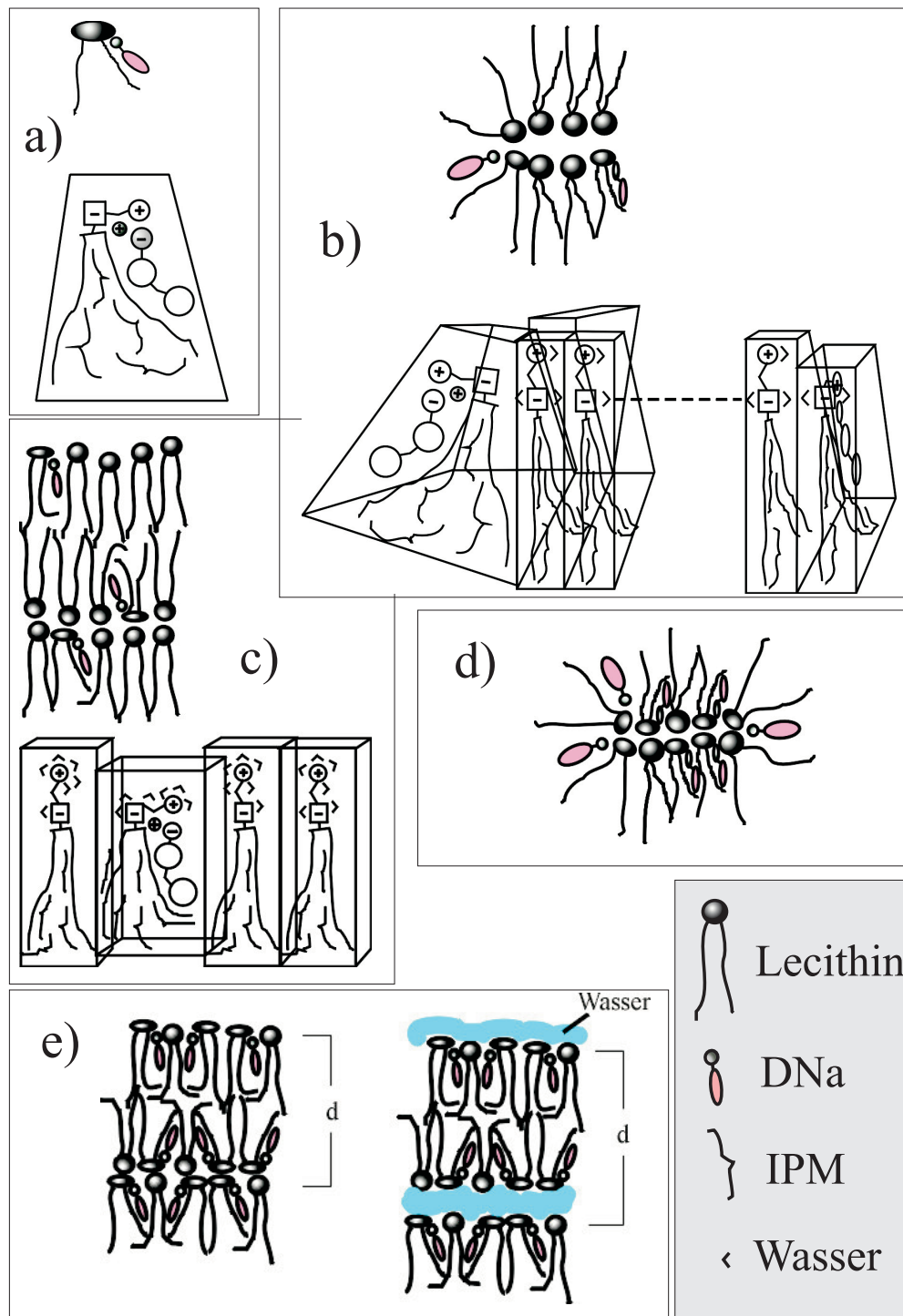


Abbildung 6.4: Modellvorschläge zum Einbau von DNa. (a) bei geringem Wassergehalt, (b) Wachstum zu Spaghettimizellen durch Hydratisierung, (c) Assoziation zu multilamellaren Bereichen. (d) Einbau von DNa in Mizellen. (e) Einbau in lamellare Flüssigkristalle (links) und Verhalten nach vermehrter Wasserzugabe (rechts). Der Übersichtlichkeit halber sind IPM und Wasser in den Schemata teilweise weggelassen worden.

halten als beim unbeladenen System statt. Durch den Einbau des Diclofenac-Na kann es zu einer Verdrängung von Wasser aus den Zwischenräumen der Phospholipidmoleküle kommen. Diesen Effekt wiesen Boicelli et al. durch eine Solubilisation von Ubichinonen in Membranen nach [204]. Folge dieser Verdrängung des Wassers ist eine vermehrte Anlagerung von Wassermolekülen im innersten Bereich des hydrophilen Kerns; es kommt so zur schnelleren Annäherung der Molekülgeometrie an eine Zylinderform mit nachfolgendem Phasenübergang (Abb. 6.4c). Aus demselben Grund wächst auch die Schichtdicke der Lamellen mit zunehmendem Wassergehalt stärker an als bei den unbeladenen Mizellen. Der bei den arzneistofffreien Systemen beobachtete Phasenübergang in ein mehrphasiges System bleibt aus. Durch den Einbau von Diclofenac-Na liegen die Phospholipid- und Arzneistoffmoleküle in einer dichteren Packung analog zum Einbau der von Boicelli et al. untersuchten Ubichinone vor [204], wofür auch die höhere Halbwertsbreite des P-NMR-Signals spricht. Das Wasser kann – wie oben bereits erläutert – nicht mehr in einem solchen Umfang wie in den unbeladenen Systemen zwischen die Phospholipidmoleküle dringen und damit die Bindungskräfte zwischen den Molekülen verringern. Die Lamellen weisen nach Einbau von DNA eine höhere Stabilität auf und zeigen, da das Wasser hauptsächlich zwischen die polaren Kopfgruppen gegenüberliegender Bilayer eingelagert wird, ein kontinuierliches Anwachsen der Schichtdicke. Da das Wasser stärker gebunden vorliegt als in den unbeladenen Systemen, wo es eine eigene Phase bildet, lässt es sich schlechter evaporisieren. Thermogravimetrische Untersuchungen bestätigen diese These. In Abb. 6.4d-e ist der Einbau höherer Konzentrationen von DNA in Mizellen und lamellare Flüssigkristalle schematisch verdeutlicht.

Die Überlegungen zur Änderung des Packungsparameters durch den Einbau von Fremdmolekülen können auch die durch den **Chargenwechsel** des Phospholipon<sup>R</sup> 90 G hervorgerufenen Änderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften erklären. Die beiden Chargen unterscheiden sich im wesentlichen durch den Anteil an einkettigen *Lysolecithinen* (Tab. 3.2), die einen wesentlich geringeren Packungsparameter aufweisen als das zweikettige Phosphatidylcholin. Eine Wechselwirkung von Phosphatidylcholin mit Lysolecithinen vermindert demzufolge den Packungsparameter und damit die Tendenz der Systeme, die sphäroiden *end caps* auszuformen. Das Gleichgewicht ist daraufhin zu längeren Mizellen hin verschoben. Tatsächlich wurden mit Ch.-Nr. 90080, die deutlich mehr Lysolecithin enthält (Tab. 3.2) sowohl mit PCS als auch mit SAXS signifikant größere bzw. längere (SAXS) Assoziate nachgewiesen.

### 6.3.2 Einbau von Timolol-Hydrogenmaleat

Timolol-Hydrogenmaleat ist, ähnlich wie Diclofenac-Na, ein amphiphiles Molekül, das jedoch größere Ausmaße und einen voluminöseren, nicht-planaren lipophilen Teil

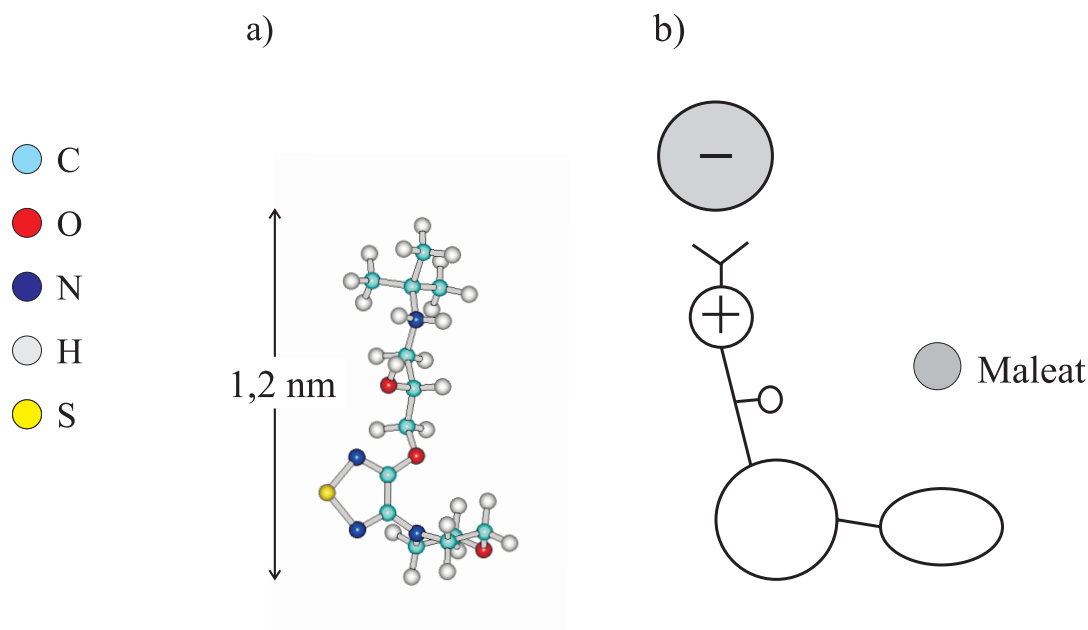


Abbildung 6.5: Energieminimierte Raumstruktur des Timolol-Hydrogenmaleats. (a) Modell aus dem Molecular Modelling. (b) Schematisches Modell.

aufweist (Abb. 6.5). Die physiko-chemischen Eigenschaften einer mit TM beladenen Standard-IML sind unabhängig davon, ob der Arzneistoff über eine wässrige Stammlösung eingearbeitet oder direkt solubilisiert wurde. Es scheint demzufolge egal zu sein, ob das Salz Timolol-Hydrogenmaleat vor der Einarbeitung dissoziiert oder undissoziiert vorliegt. Die Auswertung der IR-Spektren ergab, dass sowohl die TMA- als auch die Phosphatgruppe durch die Beladung der IML mit Timololmaleat beeinflusst werden. Die bathochrome Verschiebung der  $\nu_{as}(\text{OPO})$ -Absorptionsbande zeigt, dass TM an die Phosphatgruppe gebunden sein muss. Da gleichzeitig ein bathochromer Shift der N-CH<sub>3</sub>-Vibration für die gauche-Konformation der O-C-C-N-Kette auftritt, liegt es nahe, dass das Timolol-Kation an der Phosphat- und das Maleat-Anion an der TMA-Gruppe assoziiert vorliegt. Ob die Wechselwirkungen zwischen dem Kation und der Phosphatgruppe elektrostatische Interaktionen oder H-Brückenbindungen sind, ist schwer zu differenzieren. Lindell et al. diskutierten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Timololmaleat und ionischen Phospholipiden, während die Interaktionen des Arzneistoffs mit zwitterionischen Lecithinen auch durch H-Brücken hervorgerufen sein können [183]. Die hypsochrome Verschiebung der N-CH<sub>3</sub>-Vibration für die trans-Konformation der O-C-C-N-Kette ist mit einem gauche-trans-Übergang dieser Kette zu erklären, der mit einer Wechselwirkung der Phosphatgruppe mit Kationen einhergeht [191]. Wechselwirkungen mit dem Timolol-Kation und dem Maleat-Anion haben damit konträre Wirkung auf die Konformation der O-C-C-N-Kette. Es ist allerdings im Gegensatz zur Skizze in Abb. 6.6a davon auszugehen, dass Timolol-Kation und Maleat-Anion an verschiedenen



Lecithinmolekülen zu finden sein können.

Durch das große Volumen der nicht-planaren lipophilen Gruppen des Timolol-Hydrogenmaleats ist die Zunahme des Packungsparameters größer als bei der Wechselwirkung des Lecithins mit dem Diclofenac-Na. Ein Modell für die Wechselwirkung ist in Abb. 6.6a angegeben. Die Zunahme des Packungsparameters verringert die zur Bildung der *end caps* nötige freie Energie deutlich. Als Folge kommt es zu einer drastischen Verkleinerung der Assoziate, was mit PCS- und SAXS-Messungen beobachtet werden konnte. Einhergehend mit der Verkleinerung der Assoziate ist eine deutliche Abnahme bis hin zum Ausbleiben des bei der Ausbildung von Spaghettimizellen auftretenden Viskositätsmaximums bereits bei kleinen Arzneistoffkonzentrationen zu beobachten [3]. Shchipunov et al. beobachteten diesen Effekt durch rheologische Messungen an mit verschiedenen Alkylglykosiden beladenen Spaghettimizellen [81]. Da Alkylglykoside mit kleiner Kopfgruppe für eine Verringerung der Viskosität sorgten und solche mit großer Kopfgruppe die Viskosität erhöhten, sahen die Autoren die Änderung der zur Bildung der *end caps* nötigen freien Energie als eine Ursache für ein Ausbleiben oder eine Verstärkung der Ausbildung von Spaghettimizellen. Als verantwortlich für das Wachstum von Lecithinassoziaten zu Spaghettimizellen sehen Shchipunov et al. (a) Moleküle, die mehrere zur H-Brückenbindung fähige funktionelle Gruppen aufweisen und damit für eine Verzweigung der Mizellen sorgen [81] und (b) Moleküle, die nur eine H-Brücke ausbilden können und damit die Assoziation der Phospholipidmoleküle unterbrechen [85]. Besonders Aspekt (a) könnte auch für die Beladung der Standard-IML mit Timololmaleat von Bedeutung sein; eine Verkürzung der Mizellen durch den vergrößerten Packungsparameter und die damit verbundene niedrigere Energie, die zur Bildung von *end caps* erforderlich ist, erscheint nach den vorliegenden Erkenntnissen am wahrscheinlichsten. Ob es zusätzlich zu einer Verzweigung durch das TM kommt, ist nur mit umfangreichen rheologischen Studien zu klären [81, 94]. Für eine Behinderung der Assoziation der Phospholipidmoleküle durch das TM spricht die deutliche Abnahme der Viskosität trotz des durch SAXS nachgewiesenen Wachstums zu Spaghettimizellen. Demnach verhindert das TM die Assoziation zu Spaghettimizellen zwar nicht, die Bindungen sind jedoch so schwach, dass sie bei geringer Beanspruchung auseinanderbrechen um sich an anderer Stelle neu zu formieren.

Durch die Aufweitung der lipophilen Bereiche kann es zur vermehrten Penetration von Lösungsmittelmolekülen in die Randbereiche der Mizelle kommen. Zusammen mit einer eventuellen Abschirmung des Phosphorkerns durch das voluminöse Timolol-Kation lässt sich mit der hierbei entstehenden lipophileren Umgebung die Hochfeldverschiebung der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen deuten. Über das Verhalten des Zylinderquerschnitts bei Solubilisation von TM ist keine gesicherte Aussage zu treffen, da es sich bei den Systemen mit

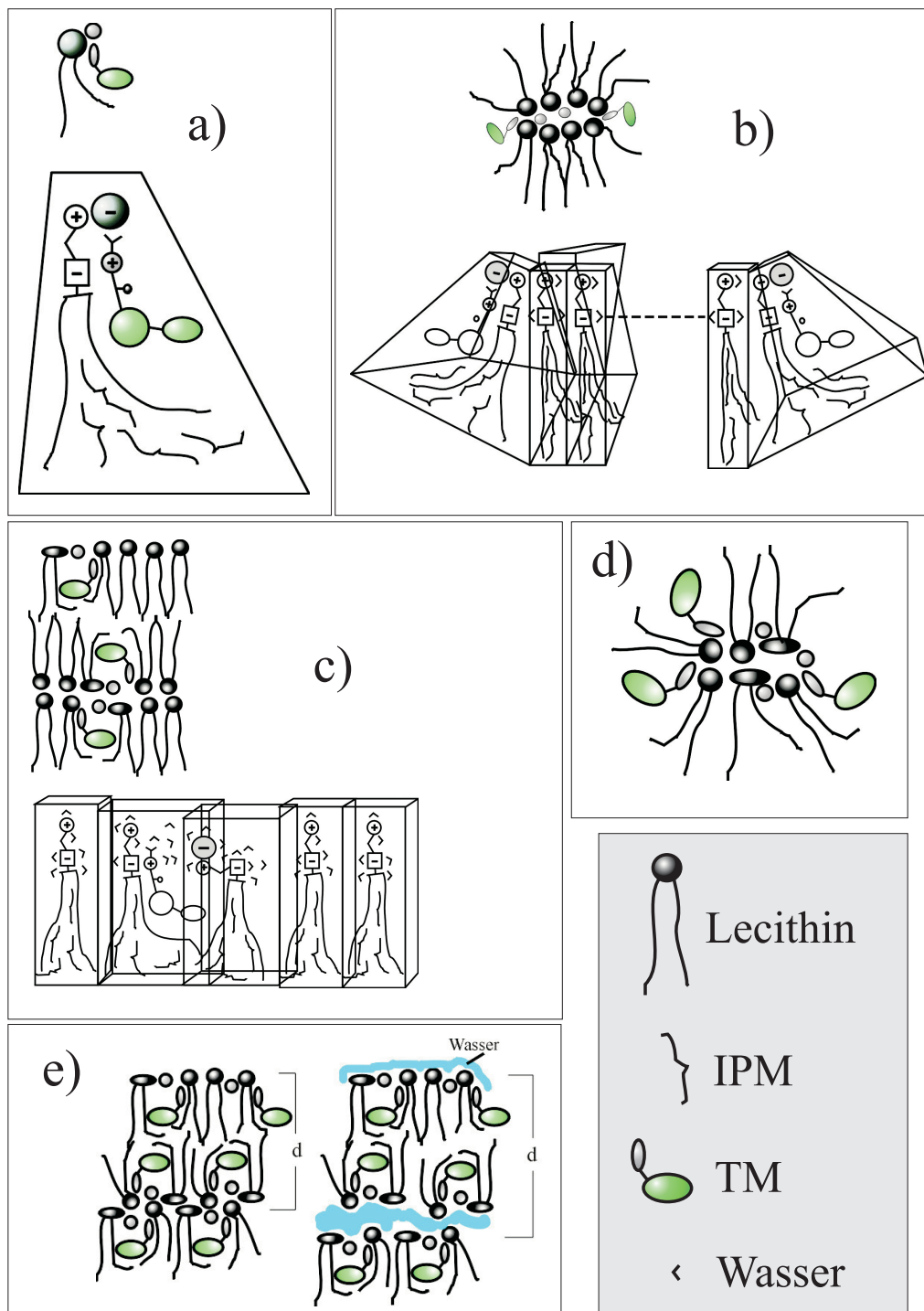


Abbildung 6.6: Modellvorschläge zum Einbau von TM. (a) bei geringem Wassergehalt, (b) Wachstum zu Spaghettimizellen durch Hydratisierung, (c) Assoziation zu multilamellaren Bereichen. (d) Einbau von TM in Mizellen. (e) Einbau in lamellare Flüssigkristalle (links) und Verhalten bei höheren Wasseranteilen (rechts). Der Übersichtlichkeit halber sind IPM und Wasser in den Schemata teilweise weggelassen worden.

hoher Arzneistoffkonzentration eher um ellipsoide Assoziate als um Zylinder handelt (Abb. 6.6d).

Mit Timolol-Hydrogenmaleat beladene inverse Mizellen können eine vergleichsweise größere Menge an Wasser aufnehmen, bevor es zu einem Phasenübergang in eine lamellare Mesophase kommt. Durch die stark konische Form der mit TM wechselwirkenden Lecithinmoleküle (Abb. 6.6a) ist eine größere Menge an hydratisierendem Wasser nötig, um die Moleküle in eine zylindrische Form zu überführen, die zur Ausbildung der Mesophasen nötig ist (Abb. 6.6c). Das Verhalten der lamellaren Mesophasen verläuft zu Beginn der Wasserzugabe nach dem gleichen Muster wie bei den mit DNA beladenen Systemen. Das Wasser wird aus den Bereichen zwischen den Lecithinmolekülen verdrängt und lagert sich zwischen die Kopfgruppen der Bilayer an. Allerdings ist dieser Prozess bei den Systemen mit 2% TM zu schwach, um ein Auseinanderdriften der Lecithinmoleküle und damit den Phasenübergang in ein mehrphasiges System zu verhindern. Dieser tritt in ähnlicher Weise wie bei den unbeladenen Systemen auf und war mit thermogravimetrischen Messungen ansatzweise nachzuweisen. Erst bei einer TM-Konzentration von 4% bleibt der Phasenübergang aus; ein der Beladung mit DNA vergleichbares Verhalten ist zu beobachten. Modelle zum Einbau hoher Konzentrationen von Timolol-Hydrogenmaleat in inverse Mizellen und lamellare Flüssigkristalle sind in Abb. 6.6d-e zu sehen.

### 6.3.3 Einbau von Pilocarpin-HCl

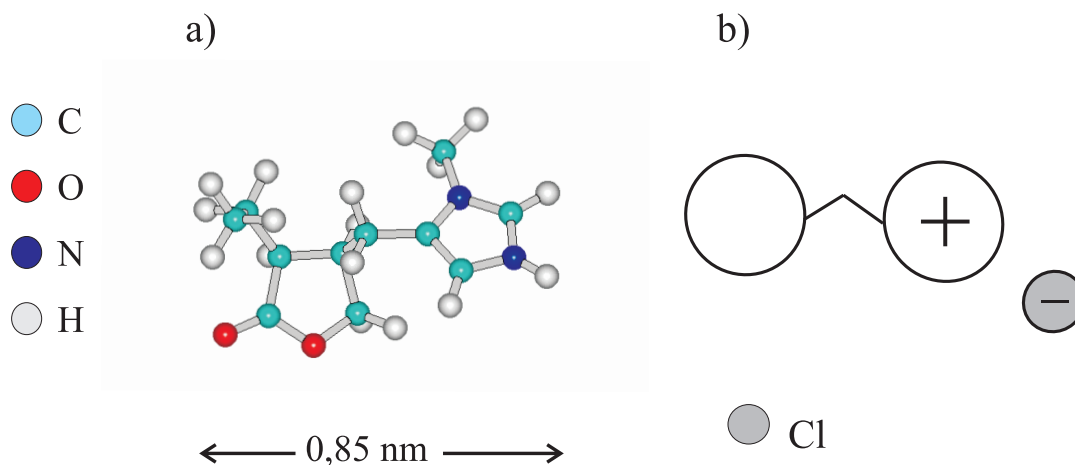


Abbildung 6.7: Energieminimierte Raumstruktur des Pilocarpin-HCl. (a) Modell aus dem Molecular Modelling. (b) Schematisches Modell.

Pilocarpin-HCl ist als hydrophiles Molekül ähnlich wie Wasser in den polaren Part der Mizellen eingebaut. Da eine FTIR-Untersuchung wegen der Probleme mit der Solubilisierung von PHCl in dekanhaltigen Lecithin-IML fehlgeschlagen ist, kann eine genaue

Lokalisation von Pilocarpin-HCl im Bereich der polaren Kopfgruppe des Lecithins nicht angegeben werden. Wahrscheinlich ist jedoch eine Wechselwirkung des Kations mit der negativen Phosphatgruppe, die gleichzeitig eine Entfaltung der O–C–C–N-Kette zur Folge hat [191]. Für letzteres spricht, dass der durch SAXS gemessene mizellare Querschnitt PHCl-haltiger Mizellen für kleine Wassergehalte etwas größer als bei den anderen Systemen ist. Ein Grund für den leicht größer ausfallenden Querschnitt kann aber auch sein, dass das Pilocarpin-Molekül einen vergleichsweise großen Platzbedarf im hydrophilen Bereich der Mizellen aufweist und so den mit SAXS detektierbaren hydrophilen Mizellkern in seinem Durchmesser vergrößert.

Durch den Einbau von PHCl in den hydrophilen Bereich der Mizellen sinkt der Packungsparameter des Lecithins (Abb. 6.8a) und damit steigt die zur Bildung der *end caps* nötige freie Energie an. Es kommt als Folge zu einem ausgeprägten Wachstum zu Spaghettimizellen, das mit SAXS beobachtet werden konnte. Die PCS-Resultate zeigen zudem bei allen Wassergehalten einen höheren hydrodynamischen Radius der PHCl-haltigen inversen Mizellen im Vergleich zu unbeladenen Mizellen. Durch den Einbau des Pilocarpin-Kations zwischen die Lecithin-Moleküle kommt es zu einer lateralen Aufweitung der Phospholipid-Assoziate und zu einer Entfaltung der O–C–C–N-Kette in die *trans*-Konfiguration [191], weshalb Lösungsmittelmoleküle in den Zwischenraum eindringen können. In den Systemen mit geringem Wassergehalt haben diese beiden Effekte zur Folge, dass die Umgebung des P-Kerns lipophiler ist, als durch die Wechselwirkung mit dem polaren Pilocarpin-Kation angenommen werden müsste. Die Tieffeldverschiebung bleibt daher bei den wasserarmen Systemen aus. Bei zunehmendem Wassergehalt können Wassermoleküle ungehindert in größerem Ausmaß an die durch den Einbau von PHCl entstehenden Zwischenräume im polaren Teil der Mizelle eindringen. Die so entstehende hydrophile Umgebung entschirmt den P-Kern und ist für die starke Tieffeldverschiebung bei Wasserzugabe verantwortlich.

Der maximal in den Mizellen solubilisierbare Wassergehalt ändert sich nicht signifikant gegenüber den unbeladenen Systemen. Hier hätte wegen des bereits durch die Solubilisation von PHCl reduzierten Packungsparameters ein niedrigerer Wassergehalt erwartet werden können. Man muss jedoch berücksichtigen, dass durch die laterale Aufweitung Wasser vermehrt zwischen den Molekülen angelagert werden kann. Das Viskositätsmaximum fällt lt. Papantoniou etwas höher als das der unbeladenen Systeme aus [107], was dafür spricht, dass PHCl das Wachstum zu Spaghettimizellen unterstützt (Abb. 6.8b,d). Allerdings nimmt für 4% PHCl das Viskositätsmaximum deutlich ab [107], was aufgrund der wesentlich längeren Assoziate, die mit SAXS nachgewiesen werden konnten, nicht zu erwarten war. Die Wechselwirkung zwischen PHCl und Lecithin muss demzufolge geringer sein als die zwischen Lecithin und Wasser. Die Folge ist, dass das

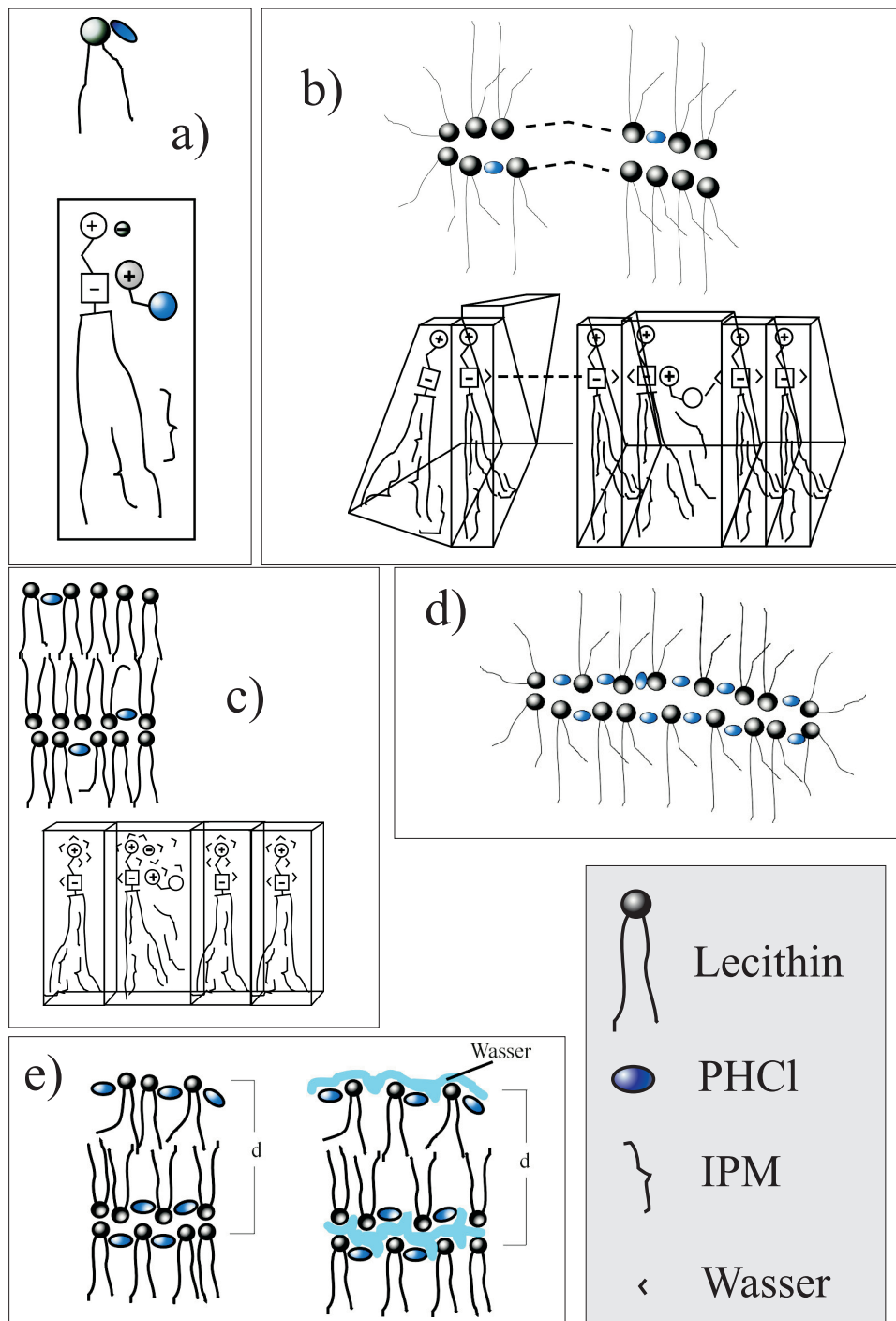


Abbildung 6.8: Modellvorschläge zum Einbau von PHCl. (a) bei geringem Wassergehalt, (b) Wachstum zu Spaghettimizellen durch Hydratisierung, (c) Assoziation zu multilamellaren Bereichen. (d) Einbau von PHCl in Mizellen. (e) Einbau von PHCl in lamellare Flüssigkristalle (links) und Verhalten bei hohem Wasseranteil (rechts). Der Übersichtlichkeit halber sind IPM und Wasser in den Schemata teilweise weggelassen worden.

PHCl eine Art „Sollbruchstelle“ der Spaghettimizellen darstellt und damit – in höheren Konzentrationen solubilisiert – die Viskosität merklich verringert.

Die Ergebnisse aus der Röntgenkleinwinkelbeugung unterstützen ebenfalls das Modell der lateralen Aufweitung der Phospholidschichten durch Pilocarpin-HCl. Ein Einschluss größerer Mengen an Wasser in die durch den lateralen Einbau der Pilocarpin-Moleküle größeren intermolekularen Abstände der Phospholipide ist möglich (Abb. 6.8c). Die Lamellen sind bei nur geringem Zuwachs des Netzebenenabstands stabil (Abb. 6.8e). Mit  $^{31}\text{P}$ -NMR- und SAXS-Messungen konnte gezeigt werden, dass Pilocarpin-Base auf eine völlig andere Art mit dem Lecithin wechselwirkt als das Pilocarpin-HCl. Damit konnte explizit nachgewiesen werden, dass nicht die Molekülform allein für die Art des Einbaus verantwortlich ist, sondern Eigenschaften wie Verteilungskoeffizient, Ladung und Affinität zur Umgebungslösung eine wesentliche Rolle für die Solubilisation in Spaghettimizellen spielen.

## 6.4 Fazit

Die in dieser Arbeit eingesetzten Untersuchungsmethoden erwiesen sich als geeignet, Informationen über den Einbau von Arzneistoffen in ternäre Lecithin/IPM/Wasser-Systeme zu gewinnen. Besonders die diffuse Röntgenkleinwinkelstreuung zur Formbestimmung inverser Mizellen und ihres Querschnitts erwies sich als ideale Ergänzung bisher etablierter Methoden wie NMR- und FTIR-Spektroskopie.

Von primärem pharmazeutischen Interesse ist die Anwendung der Spaghettimizellen als Retardformulierungen. Der Weg der Arzneistofffreigabe erfolgt in solchen Systemen über eine Transformation der IML durch Kontakt mit Wasser in einen lamellaren Flüssigkristall. Die Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffträger und Arzneistoff wurden bei Wasserkonzentrationen von 0.5% bis 40% untersucht. Anhand der Resultate wurden Modelle postuliert, die es erlauben, in einem gewissen Maße Voraussagen über den Einbau von Arzneistoffen in den Träger zu treffen.

Der universelle Einsatz von Spaghettimizellen als Arzneistoffträger wurde von Papantoniou angezweifelt, da bei Beladung mit bestimmten Arzneistoffen die Ausbildung eines gelartigen Zustands ausbleibt [107]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass das Wachstum zu Spaghettimizellen zwar behindert werden kann, aber niemals völlig ausbleibt. Das gilt ebenso für die Transformation in lamellare Mesophasen. Die invers mizellare Lösung kann demnach auch als Träger für Arzneistoffe wie Timolol-Hydrogenmaleat eingesetzt werden, die die Viskosität des Systems deutlich verringern. Zur Entwicklung

---

einer Retardformulierung mit inversen Lecithin-Spaghettimizellen sind Erkenntnisse aus Freisetzungsuntersuchungen erforderlich, die zusammen mit den postulierten Modellen ein umfassendes Verständnis des Retardmechanismus geben können. Ein solches Verständnis sollte es erlauben, Arzneistoffträger und Arzneistoffe gezielt einzusetzen. Die Modellansätze dazu werden in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung

Die Charakterisierung arzneistoffbeladener invers mizellarer Lösungen aus 30% Lecithin in Isopropylmyristat mit diffuser Röntgenkleinwinkelstreuung stand im Vordergrund dieser Arbeit. Als Modellarzneistoffe wurden Pilocarpin-HCl, Timolol-Hydrogenmaleat und Diclofenac-Natrium in Konzentrationen von 0.5 bis maximal 10% eingesetzt. Ein weiteres Ziel war die Lokalisierung der Arzneistoffe in den inversen Mizellen über die Untersuchung ihrer Wechselwirkungen mit der Trägersubstanz Lecithin.

Die Röntgenkleinwinkelstreuung als Methode zur Charakterisierung von Form und Struktur eines invers mizellaren Arzneistoffträgers konnte in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzt werden. Anhand von Messungen an Natrium-Dodecylsulfat-Mizellen wurde gezeigt, dass sich die vorhandene Kleinwinkelanlage zur Charakterisierung von Form und Dimension kolloidaler Arzneistoffträger im Größenbereich bis zu 20 nm eignet. Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung konnte das durch Wasserzugabe induzierte eindimensionale Wachstum inverser Mizellen aus Lecithin und Isopropylmyristat zu langen, zylindrischen Spaghettimizellen eindeutig nachgewiesen werden. Zudem gelang es, den Querschnitt der Spaghettimizellen isoliert zu betrachten. Weil die Röntgenkleinwinkelstreuung nur Elektronendichteunterschiede „sieht“, ist nur der hydrophile Kern der inversen Mizellen sichtbar.

Höhere Wassergehalte führten zu einem Phasenübergang der Spaghettimizellen in ein System, das lamellare Flüssigkristalle enthält. Beide Phasenlagen des Drug Delivery Systems – die invers mizellare Lösung und die lamellare Mesophase – wurden unter Einfluss der Modellarzneistoffe physiko-chemisch charakterisiert. Neben der Röntgenkleinwinkelstreuung kamen Photonenkorrelationsspektroskopie,  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie, FTIR-Spektroskopie, Polarisations- und Elektronenmikroskopie sowie Röntgenkleinwinkelbeugung mit Erfolg zum Einsatz.



Die Resultate führten zur modellhaften Darstellung von Wechselwirkungen zwischen der Trägersubstanz Lecithin und den Arzneistoffen. Darüber hinaus konnten aus den spektroskopischen Untersuchungen außer beim PHCl die jeweiligen Interaktionen des Arzneistoffs mit der Trimethylammonium- und/oder Phosphatgruppe des Lecithins nachgewiesen werden. Durch die Interaktion des Arzneistoffs mit dem Lecithin veränderten sich dessen Geometrie, Raumbedarf und Ladungscharakteristik. Die Röntgenkleinwinkel-Messungen gaben Aufschluss über Formveränderungen der inversen Mizellen und Strukturveränderungen der Mesophasen aufgrund dieser veränderten Eigenschaften.

Abschließend wurden Modelle aufgestellt, die basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit und der Literatur den wahrscheinlichsten Einbau der Arzneistoffe in die inversen Mizellen zeigen.

# Literaturverzeichnis

- [1] SCARTAZZINI, R. und P.L. LUISI: *Organogels from Lecithins*. J. Phys. Chem., 92:829–833, 1988.
- [2] SCHURTENBERGER, P., R. SCARTAZZINI, L.J. MAGID, M.E. LESER und P.L. LUISI: *Structural and Dynamic Properties of Polymer-like Reverse Micelles*. J. Phys. Chem., 94:3695–3701, 1990.
- [3] MACKEBEN, S., M. MÜLLER und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *The influence of water on phase transitions of a drug-loaded reverse micellar solution into lamellar liquid crystals*. Colloid Surface A, 183–185:699–713, 2001.
- [4] WILLIMANN, H., P. WALDE, P.L. LUISI, A. GAZZANIGA und F. STROPPOLO: *Lecithin Organogel as Matrix for Transdermal Transport of Drugs*. J. Pharm. Sci., 81(9):871–875, 1992.
- [5] BHATNAGAR, S. und S.P. VYAS: *Organogel-based system for transdermal delivery of propranolol*. J. Microencapsul., 11(4):431–438, 1994.
- [6] BONINA, F.P., L. MONTENEGRO, N. SCROFANI, E. ESPOSITO, R. CORTESI, E. MENEGATTI und C. NASTRUZZI: *Effects of phospholipid based formulations on in vitro and in vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate*. J. Control. Release, 34:53–63, 1995.
- [7] ANAND, B., S.S. PISAL, A.R. PARADKAR und K.R. MAHADIK: *Applications of Organogels in Pharmaceuticals*. J. Sci. Ind. Res. India, 60:311–318, 2001.
- [8] MÜLLER-GOYMANN, C.C. und H.-J. HAMANN: *Sustained release from reverse micellar solutions by phase transformations into lamellar liquid crystals*. J. Control. Release, 23:165–174, 1993.
- [9] PAPANTONIOU, I. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Influence of the phase transformation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystals on sustained drug release. Part II: Sustained release of diclofenac sodium from reverse micellar solutions via lamellar mesophases*. Pharm. Pharmacol. Lett., 2:49–52, 1995.

- [10] TEGTMEYER, S., I. PAPANTONIOU und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 51:119–125, 2001.
- [11] FRESTA, M., G. PUGLISI, C.A. VENTURA, A.M. PANICO, M.G. MAZZONE und V. MOSCHETTI: *Lecithin Organogels as Potential Ophthalmic Drug Delivery Systems. A Toxicological Study*. J. Control. Release, 48:328–329, 1997.
- [12] PAOLINO, D., G. PUGLISI und M. FRESTA: *Potential Ophthalmic Application for Lecithin Organogels*. Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV Florence, Seiten 947–948, 2002.
- [13] SCHENKER, H., S. MALONEY, C. LISS, G. GORMLEY und D. HARTENBAUM: *Patient Preference, Efficacy, and Compliance with Timolol Maleate Ophthalmic Gel-Forming Solution Versus Timolol Maleate Ophthalmic Solution in Patients with Ocular Hypertension or Open-Angle Glaucoma*. Clin. Ther., 21(1):138–147, 1999.
- [14] TRUEBLOOD, J.H., R.M. ROSSOMONDO, W.H. CARLTON und L.A. WILSON: *Corneal Contact Times of Ophthalmic Vehicles*. Arch. Ophthalmol., 93:127–130, 1975.
- [15] PAPANTONIOU, I. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Influence of the phase transformation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystals on sustained drug release. Part I: Physicochemical characterization of systems containing either diclofenac acid or diclofenac sodium*. Pharm. Pharmacol. Lett., 1:28–31, 1995.
- [16] MACKEBEN, S. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Solubilization of timolol maleate in reversed micellar systems. Measurement of particle size using SAXS and PCS*. Int. J. Pharm., 196:207–210, 2000.
- [17] SCHNEEWEIS, A.: *Kontrollierte Wirkstofffreigabe bei rektaler Applikation durch applikationsinduzierte Phasentransformation invers mizellarer Lösungen in flüssigkristalline Systeme*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1999.
- [18] HAMANN, H.J. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Wechselwirkung des mesogenen Arzneistoffs Fenoprofen mit einem flüssig-kristallinen Lecithinvehikel*. Acta Pharm. Technol., 35(3):121–127, 1989.
- [19] ATKINS, P.W.: *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 2. Auflage, 1996.
- [20] DÖRFLER, H.-D.: *Grenzflächen- und Kolloidchemie*. VCH, Weinheim, 1994.

- [21] STENIUS, P.: *Micelles and Reversed Micelles: A Historical Overview*. In: LUISI, P.L. und B.E. STRAUB (Herausgeber): *Reverse Micelles*. Plenum Press, New York and London, 1984.
- [22] FROMHERZ, P.: *Micelle Structure: A Surfactant-Block Model*. Chem. Phys. Lett., 77(3):460–466, 1981.
- [23] SCHULMAN, J.H. und T.P. HOAR: *Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle*. Nature, 152:102–103, 1943.
- [24] EICKE, H.F. und H. CHRISTEN: *Nucleation Process of Micelle Formation in Apolar Solvents*. J. Colloid Interf. Sci., 48(2):281–290, 1974.
- [25] CORRELL, G.D., R.N. CHESER III, F. NOME und J.H. FENDLER: *Fluorescence Probes in Reversed Micelles. Luminescence Intensities, Lifetimes, Quenching, Energy Transfer, and Depolarization of Pyrene Derivatives in Cyclohexane in the Presence of Dodecylammonium Propionate Aggregates*. J. Am. Chem. Soc., 100(4):1254–1262, 1978.
- [26] RAVEY, J.C., M. BUZIER und C. PICOT: *Micellar Structures of Nonionic Surfactants in Apolar Media*. J. Colloid Interf. Sci., 97(1):9–25, 1984.
- [27] MULLER, N.: *A Multiple-Equilibrium Model for the Micellization of Ionic Surfactants in Nonaqueous Solvents*. J. Phys. Chem., 72(3):287–294, 1975.
- [28] HAMLEY, I.W.: *Introduction to Soft Matter. Polymers, Colloids, Amphiphiles and Liquid Crystals*. John Wiley & Sons, Chichester · New York, 2000.
- [29] BAUER, K.H., K.-H. FRÖMMING und C. FÜHRER: *Pharmazeutische Technologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 1997.
- [30] MAITRA, A.: *Determination of Size Parameters of Water-Aerosol OT-Oil Reverse Micelles from their Nuclear Magnetic Resonance Data*. J. Phys. Chem., 88:5122–5125, 1984.
- [31] RILLMANN, T.: *Untersuchungen an einfachen W/O-Modellsystemen*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 2000.
- [32] BARRELEIRO, P.C.A. und P. ALEXANDRIDIS: *<sup>13</sup>C-NMR Evidence on Amphiphilic Lifetime in Reverse (Water-in-Oil) Micelles Formed by a Poloxamer Block Copolymer*. J. Colloid Interf. Sci., 206:357–360, 1998.
- [33] PILPEL, N.: *Micelle Formation in Benzene*. T. Faraday Soc., 57:1426–1433, 1961.

- [34] EICKE, H.-F.: *Surfactants in Nonpolar Solvents - Aggregation and Micellization*. Top. Curr. Chem., 87:85–145, 1980.
- [35] MULLER, N.: *Attempt at a Unified Interpretation of the Self-Association of 1-1 Ionic Surfactants in Solvents of Low Dielectric Constant*. J. Colloid Interf. Sci., 63(2):383–393, 1978.
- [36] EICKE, H.F. und H. CHRISTEN: *On the Stability of Micelles in Apolar Media*. J. Colloid Interf. Sci., 46(3):417–427, 1974.
- [37] SCHURTENBERGER, P., R. SCARTAZZINI und P.L. LUISI: *Viscoelastic properties of polymerlike reverse micelles*. Rheol. Acta, 28:372–381, 1989.
- [38] TANFORD, C.: *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. John Wiley & Sons, New York, 2. Auflage, 1980.
- [39] ISRAELACHVILI, J.N., D.J. MITCHELL und B.W. NINHAM: *Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers*. J. Chem. Soc. Farad. T. II, 72:1525–1568, 1976.
- [40] ISRAELACHVILI, J.N., S. MARČELJA und R.G. HORN: *Physical principles of membrane organization*. Q. Rev. Biophys., 13(2):121–200, 1980.
- [41] SCHNEEWEIS, A. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *In Vivo and In Vitro Diclofenac Sodium Evaluation After Rectal Application of Soft Gelatine Capsules Enabling Application Induced Transformation (AIT) into a Semisolid System of Liquid Crystals (SSLC) for Controlled Release*. Pharm. Res., 14(12):1726–1729, 1997.
- [42] MICHEL, F. und M.P. PILENI: *Synthesis of Hydrophobic Ribonuclease by Using Reverse Micelles. Structural Study of AOT Reverse Micelles Containing Ribonuclease Derivatives*. Langmuir, 10:390–394, 1994.
- [43] YANO, J., H. FÜREDI-MILHOFFER, E. WACHTEL und N. GARTI: *Crystallization of Organic Compounds in Reversed Micelles. I. Solubilization of Amino Acids in Water-Isooctane-AOT Microemulsions*. Langmuir, 16:9996–10004, 2000.
- [44] MOTTE, L., A. LEBRUN und M.P. PILENI: *Influence of the preparation mode on the size of CdS particles synthesised „in situ“ in reverse micelles*. Prog. Coll. Pol. Sci. S, 89:99–102, 1992.
- [45] NAGASAKI, Y. und K. KATAOKA: *A reactive polymeric micelle as drug vehicle for active targeting*. Polym. Preprints, 40:286–287, 1999.

- [46] SHAWER, M., P. GREENSPAN, S. ØIE und D.R. LU: *VLDL-Resembling Phospholipid-Submicron Emulsion for Cholesterol-Based Drug Targeting*. J. Pharm. Sci., 91:1405–1413, 2002.
- [47] ZULAUF, M. und H.-F. EICKE: *Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary System H<sub>2</sub>O/Aerosol-OT/Isooctane as Studied by Photon Correlation Spectroscopy*. J. Phys. Chem., 83(4):480–486, 1979.
- [48] KUMAR, V.V., C. KUMAR und P. RAGHUNATHAN: *Studies on Lecithin Reverse Micelles: Optical Birefringence, Viscosity, Light Scattering, Electrical Conductivity, and Electron Microscopy*. J. Colloid Interf. Sci., 99:315–323, 1984.
- [49] DEBYE, P. und W. PRINS: *Micellar Dispersion of  $\alpha$ -Monoglycerides in Benzene and Chlorobenzene*. J. Coll. Sci., 13:86–98, 1958.
- [50] ZHU, D.-M., X. WU und Z.A. SCHELLY: *Reverse Micelles and Water in Oil Microemulsions of Triton X-100 in Mixed Solvents of Benzene and n-Hexane. Dynamic Light Scattering and Turbidity Studies*. Langmuir, 8:1538–1540, 1992.
- [51] EICKE, H.-F. und P. KVITA: *Reverse Micelles and Aqueous Microphases*. In: LUISI, P.L. und B.E. STRAUB (Herausgeber): *Reverse Micelles*. Plenum Press, New York and London, 1984.
- [52] TAVERNIER, S.M.F. und R. GIJBELS: *Non-ideality in Systems Containing Inverted Micelles of Anionic Surfactants in Apolar Solvents. Corrections for Vapour Pressure Osmometric Data*. B. Soc. Chim. Belg., 89(8):579–588, 1980.
- [53] SJÖBLOM, J., K. ROSENQVIST und P. STENIUS: *Reversed micellar solutions in the system sodium octanoate/decanol/water: Model calculations and dynamic light scattering measurements*. Colloid & Polymer Sci., 260:82–88, 1982.
- [54] ADAM, G.: *Viskosität von makromolekularen Lösungen*. In: G. ADAM, P. LÄUGER und G. STARK (Herausgeber): *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer, Berlin, 1988.
- [55] YU, Z.-J., N.-F. ZHOU und R.D. NEUMAN: *The Role of Water in the Formation of Reversed Micelles: An Antimicellization Agent*. Langmuir, 8:1885–1888, 1992.
- [56] YU, Z.-J. und R.D. NEUMAN: *Giant Rodlike Reversed Micelles*. J. Am. Chem. Soc., 116:4075–4076, 1994.
- [57] HILFRIKER, R., H.-F. EICKE, W. SAGER, C. STEEB, U. HOFMEIER und R. GEHRKE: *Form and Structure of Water/AOT/Oil Microemulsions from Synchrotron SAXS*. Ber. Bunsen. Phys. Chem., 94:677–683, 1990.

- [58] DAY, R.A., B. ROBINSON, J.H.R. CLARKE und J.V. DOHERTY: *Characterisation of Water-containing Reversed Micelles by Viscosity and Dynamic Light Scattering Methods*. J. Chem. Soc. Farad. T. I, 75:132–139, 1979.
- [59] HIRAI, M., R. KAWAI-HIRAI, M. SANADA, H. IWASE und S. MITSUYA: *Characteristics of AOT Microemulsion Structure Droplets on Apolar Solvents*. J. Phys. Chem. B, 103:9658–9662, 1999.
- [60] HAANDRIKMAN, G., G.J.R. DAANE, F.J.M. KERKHOF, N.M. VAN OS und L.A.M. RUPERT: *Microcalorimetric Investigation of the Solubilization of Water in Reversed Micelles and Water-in-Oil Microemulsions*. J. Phys. Chem, 96:9061–9068, 1992.
- [61] GREENSPOON, N. und E. WACHTEL: *Reverse Micelles as a Model System for Carbohydrate Binding*. J. Am. Chem. Soc., 113:7233–7236, 1991.
- [62] WONG, M., J.K. THOMAS und T. NOWAK: *Structure and State of H<sub>2</sub>O in Reversed Micelles*. 3. J. Am. Chem. Soc., 99(14):4730–4736, 1977.
- [63] ZINSLI, P.E. und H.-F. EICKE: *Photon-Sampling-Technik zur Untersuchung des Einflusses solubilisierten Wassers auf invertierte micellare Aggregate*. Prog.. Coll. Pol. Sci. S, 65:158–161, 1978.
- [64] VERBEECK, A., G. VOORTMANS, C. JANCKERS und F.C. DE SCHRYVER: *Characterization and Stabilization of Inverse Micelles*. Langmuir, 5:766–776, 1989.
- [65] PETIT, C., A.S. BOMMARIUS, M.-P. PILENI und T.A. HATTON: *Characterization of a Four-Component Cationic Reversed Micellar System: Dodecyltrimethylammonium Chloride/Hexanol/n-Heptane and 0.1 M KCl Solution*. J. Phys. Chem., 96:4653–4658, 1992.
- [66] KAWAI, T., N. SHINDO und K. KON-NO: *Solubilization Behaviour of Water in Hexaethylene Glycol Dodecyl Ether Reverse Micelles in Apolar Solvents*. J. Surface Sci. Technol., 8(2):145–153, 1992.
- [67] QI, L. und J. MA: *Investigation of the Microenvironment in Nonionic Reverse Micelles Using Methyl Orange and Methylene Blue as Absorption Probes*. J. Colloid Interf. Sci., 197:36–42, 1998.
- [68] OLOFSSON, G., J. KIZLING und P. STENIUS: *Partial Molar Enthalpies of Water and Surfactant in Solutions of Pentaethyleneoxide Dodecyl Ether and Water in Hexadecane*. J. Colloid Interf. Sci., 111(1):213–222, 1986.

- [69] LEGRAND, D.G.: *Small-Angle X-ray Scattering from Block Polymer Micelles*. J. Polym. Sci. Pol. Sym., 63:147–154, 1978.
- [70] ZHOU, S., J. SU und B. CHU: *Water-Induced Micellar Structure Change in Pluronic P103/Water/o-Xylene Ternary System*. J. Polym. Sci., 36:889–900, 1998.
- [71] PRICE, H.I. und W.C. MCCULLAGH LEWIS: *The physico-chemical behaviour of lecithin. I. The capillary activity of lecithin as a function of pH*. Biochem. J., 23:1030, 1929.
- [72] ELWORTHY, P.H.: *Micelle Formation by Lecithin in Benzene*. J. Chem. Soc., Seiten 813–817, 1959.
- [73] GIOMINI, M., A.M. GIULIANI, E. TROTTA und C.A. BOICELLI: *The Use of NMR Parameters for the Evaluation of the Critical Micelle Concentration of Lecithin in Reverse Micellar Solutions*. Chem. Phys. Lett., 158(3/4):334–340, 1989.
- [74] BOICELLI, C.A., F. CONTI, M. GIOMINI und A.M. GIULIANI: *Interactions of small molecules with phospholipids in inverted micelles*. Chem. Phys. Lett., 89(6):490–496, 1982.
- [75] FUNG, B.M. und J.L. MCADAMS: *The interaction between water and the polar head in inverted phosphatidylcholine micelles*. Biochim. Biophys. Acta, 451:313–320, 1976.
- [76] KUMAR, V.V. und P. RAGHUNATHAN: *Proton NMR Studies of the Interaction of Water with Lecithin in Non-Polar Organic Media*. Chem. Phys. Lipids, 41:159–171, 1986.
- [77] MAITRA, A., T. KUMAR JAIN und Z. SHERVANI: *Interfacial Water Structure in Lecithin-Oil-Water Reverse Micelles*. Colloid Surface, 47:255–267, 1990.
- [78] SHCHIPUNOV, Y.A. und H. HOFFMANN: *Thinning and thickening effects induced by shearing in lecithin solutions of polymer-like micelles*. Rheol. Acta, 39:542–553, 2000.
- [79] SCHURTENBERGER, P., Q. PENG, M.E. LESER und P.L. LUISI: *Structure and Phase Behavior of Lecithin-Based Microemulsions: A Study of the Chain Length Dependence*. J. Colloid Interf. Sci., 156:43–51, 1993.
- [80] CAPITANI, D., A.L. SEGRE, R. SPARAPAINI, M. GIUSTINI, R. SCARTAZZINI und P.L. LUISI: *Lecithin Microemulsion Gels: A NMR Study of Molecular Mobility Based on Line Widths*. Langmuir, 7:250–253, 1991.



- [81] SHCHIPUNOV, Y.A., E.V. SHUMILINA, W. ULBRICHT und H. HOFFMANN: *The Branching of Reversed Polymer-like Micelles of Lecithin by Sugar-Containing Surfactants*. J. Colloid Interf. Sci., 211:81–88, 1999.
- [82] ALIOTTA, F., M.E. FONTANELLA, M. PIERUCCINI, G. SALVATO, S. TRUSSO, C. VASI und R.E. LECHNER: *Percolative phenomena in lecithin reverse micelles: the role of water*. Colloid Polym. Sci., 280:193–202, 2002.
- [83] SHERVANI, Z., T.K. JAIN und A. MAITRA: *Nonconventional lecithin gels in hydrocarbon oils*. Colloid Polym. Sci., 269:720–726, 1991.
- [84] SHUMILINA, E.V., Y.L. KHROMOVA und Y.A. SHCHIPUNOV: *A Study of the Structure of Lecithin Organic Gels by Fourier Transform IR Spectroscopy*. Russ. J. Phys. Chem., 74(7):1083–1092, 2000.
- [85] SHCHIPUNOV, Y.A.: *Lecithin organogel. A micellar system with unique properties*. Colloid Surface A, 183–185:541–554, 2001.
- [86] HANAHAN, D.J.: *A Guide to Phospholipid Chemistry*. Oxford University Press, Oxford · New York, 1997.
- [87] APPELL, J., G. PORTE, A. KHATORY, F. KERN und S.J. CANDAU: *Static and dynamic properties of a network of wormlike surfactant micelles (cetylpyridium chlorate in sodium chlorate brine)*. J. Phys. II, 2:1045–1052, 1992.
- [88] SCHURTENBERGER, P., L.J. MAGID, P. LINDNER und P.L. LUISI: *A sphere to flexible coil transition in Lecithin reverse micellar solutions*. Prog. Coll. Pol. Sci. S, 89:274–277, 1992.
- [89] SCHURTENBERGER, P. und C. CAVACO: *Polymer-like Lecithin Reverse Micelles. I. A Light Scattering Study*. Langmuir, 10:100–108, 1994.
- [90] SCHURTENBERGER, P., G. JERKE, C. CAVACO und J. SKOV PEDERSEN: *Cross-Section Structure of Cylindrical and Polymer-like Micelles from Small-Angle Scattering Data. 2. Experimental Results*. Langmuir, 12:2433–2440, 1996.
- [91] LUISI, P.L., R. SCARTAZZINI, G. HAERING und P. SCHURTENBERGER: *Organogels from water-in-oil microemulsions*. Colloid Polymer Sci., 268:356–374, 1990.
- [92] ALIOTTA, F., M.E. FONTANELLA, M. SACCHI, C. VASI, G. LA MANNA und V. TURCO-LIVERI: *About entangled networks of worm-like micelles: a rejected hypothesis*. Colloid Polym. Sci., 274(9):809–818, 1996.

- [93] ANGELICO, R., G. PALAZZO, G. COLAFEMMINA, P.A. CIRKEL, M. GIUSTINI und A. Ceglie: *Water Diffusion and Headgroup Mobility in Polymer-like Reverse Micelles: Evidence of a Sphere-to-Rod-to-Sphere Transition*. J. Phys. Chem. B, 102:2883–2889, 1998.
- [94] SHCHIPUNOV, Y.A. und H. HOFFMANN: *Growth, Branching and Local Ordering of Lecithin Polymer-Like Micelles*. Langmuir, 14:6350–6360, 1998.
- [95] SCHNEEWEIS, A., I. PAPANTONIOU und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Diclofenac sodium plasma concentrations in dogs after peroral application of soft gelatine capsules enabling application induced transformation (AIT) into a semisolid system of liquid crystals (SSLC) compared to in vitro drug release*. Pharm. Pharmacol. Lett., 7:42–44, 1997.
- [96] MÜLLER, M.: *Charakterisierung der timololmaleathaltigen invers mizellaren Lösungen als mögliche Retardarzneiformen zur Glaukombehandlung*. Diplomarbeit, Universität Halle, 1998.
- [97] UPPADHYAY, A.K., L.K. OMRAY, A.J. KHOPADE und N.K. JAIN: *Studies on a reverse micelle-lamellar phase transition based depot preparation of rifampicin*. Pharmazie, 52(12):961–962, 1997.
- [98] TEGTMEYER, S.: *Kultivierung und Charakterisierung von bovinen in vitro Cornea-Modellen für Permeationsuntersuchungen*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 2000.
- [99] MÜLLER-GOYMANN, C.C.: *Anwendung lyotroper Flüssigkristalle in Pharmazie und Medizin*. In: STEGEMEYER, H. (Herausgeber): *Lyotrope Flüssigkristalle*. Steinkopff, Darmstadt, 1999.
- [100] HILTROP, K.: *Lyotrope Flüssigkristalle: Grundlagen und Historie*. In: STEGEMEYER, H. (Herausgeber): *Lyotrope Flüssigkristalle*. Steinkopff, Darmstadt, 1999.
- [101] SMALL, D.M.: *The Physical Chemistry of Lipids*. Nummer 4 in *Handbook of Lipid Research*. Plenum Press, New York and London, 2. Auflage, 1988.
- [102] LUZZATI, V., H. MUSTACCHI, A. SKOULIOS und F. HUSSON: *La Structure des Colloïdes d'Association. I. Les Phases Liquide-Crystallines des Systèmes Amphiphile-Eau*. Acta Crystallogr., 13:660–667, 1960.
- [103] HAMANN, H.J.: *Wechselwirkungen mesogener Arzneistoffe mit kolloidalen Lecithinassoziaten am Beispiel des Fenoprofens*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1990.

- [104] BOULIGAND, Y.: *Defects and Textures*. In: DEMUS, D., J. GOODBY, G.W. GRAY, H.-W. SPIESS und V. VILL (Herausgeber): *Physical Properties of Liquid Crystals*. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [105] SAUPE, A.: *Textures, Deformations, and Structural Order of Liquid Crystals*. J. Colloid Interf. Sci., 58(3):549–558, 1977.
- [106] ROSEVEAR, F.B.: *The Microscopy of the Liquid Crystalline Neat and Middle Phases of Soaps and Synthetic Detergents*. J. Am. Oil Chem. Soc., 31:628–639, 1954.
- [107] PAPANTONIOU, I.: *Invers mizellare Lösungen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung durch applikationsinduzierte Transformation in lyotrope Mesophasen*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1995.
- [108] Rote Liste Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. Editio Cantor, Aulendorf, 2001.
- [109] LARSEN, C. und H. BUNDGAARD: Zitiert aus:. [168].
- [110] DOLDER, R. und F.S. SKINNER (Herausgeber): *Ophthalmika. Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*. WVG, Stuttgart, 4. Auflage, 1990.
- [111] MUTSCHLER, E.: *Arzneimittelwirkungen*. WVG, Stuttgart, 7. Auflage, 1996.
- [112] PARNHAM, M.J. und A. WENDEL: *Phospholipids and Liposomes*. Nattermann Phospholipid GmbH, 1995. Scientific Publication No. 2.
- [113] NATTERMANN PHOSPHOLIPID GMBH, D-Köln: *Phospholipids in Cosmetics and Pharmaceuticals*, April 1999.
- [114] GHYCZY, M. und R. NIEMANN: *Haut und Liposomen*. Nattermann Phospholipid GmbH, 1992. Wissenschaftliche Publikation Nr. 1.
- [115] HUNNIUS: *Pharmazeutisches Wörterbuch*. de Gruyter, 8. Auflage, 1998.
- [116] FRIEDRICH, I.: *Physikochemische Charakterisierung invers mizellarer Lösungen zur ophthalmologischen Anwendung*. Diplomarbeit, Universität Halle, 1999.
- [117] KRISCHNER, H.: *Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse*. Vieweg + Sohn, Braunschweig, 4. Auflage, 1990.
- [118] GUPTA, R., H.S. MURALIDHARA und H.T. DAVIS: *Structure and Phase Behavior of Phospholipid-Based Micelles in Nonaqueous Media*. Langmuir, 17:5176–5183, 2001.

- [119] MCNEIL-WATSON, F.K.: *A New Instrument for Particle Size Analysis and Electrophoretic Mobility Measurement Using Photon Correlation Spectroscopy*. In: LLOYD, P.J. (Herausgeber): *Particle Size Analysis*. Wiley & Sons, New York, 1988.
- [120] VOGEL, H.: *Gerthsen Physik*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 18. Auflage, 1995.
- [121] MÜLLER, R.H. und R. SCHUHMANN: *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*, Band 38 der Reihe *apv Paperback*. WVG, Stuttgart, 1996.
- [122] MEYER, E. und D. GUICKING: *Schwingungslehre*. Vieweg + Sohn, Braunschweig, 1974.
- [123] OSTROWSKY, N.: *Particle Characterisation by Photon Correlation Spectroscopy*. In: LLOYD, P.J. (Herausgeber): *Particle Size Analysis*. Wiley & Sons, New York, 1988.
- [124] FORD, N.C.: *Theory and Practice of Correlation Spectroscopy*. In: DAHNEKE, B.E. (Herausgeber): *Measurement of Suspended Particles by Quasi-Elastic Light Scattering*. Wiley & Sons, New York, 1983.
- [125] PIKE, E.R., D. WATSON und F. MCNEIL-WATSON: *Analysis of Polydisperse Scattering Data II*. In: DAHNEKE, B.E. (Herausgeber): *Measurement of Suspended Particles by Quasi-Elastic Light Scattering*. Wiley & Sons, New York, 1983.
- [126] STOCK, R.S. und W.H. RAY: *Interpretation of Photon Correlation Spectroscopy Data: A Comparison of Analysis Methods*. J. Polym. Sci., 23:1393–1447, 1985.
- [127] ZERO, K.: *Dynamic Depolarized Light-Scattering Studies of Rodlike Particles*. In: DAHNEKE, B.E. (Herausgeber): *Measurement of Suspended Particles by Quasi-Elastic Light Scattering*. Wiley & Sons, New York, 1983.
- [128] SCHURTENBERGER, P. und C. CAVACO: *Polymer-like Lecithin Reverse Micelles. I. A Light Scattering Study*. Langmuir, 10:100–108, 1994.
- [129] FALBE, J. und M. REGITZ (Herausgeber): *Römpf Chemie-Lexikon A-Z*. Thieme, Stuttgart, 9. Auflage, 1995.
- [130] PENG, Q. und P.L. LUISI: *The behavior of proteases in lecithin reverse micelles*. Eur. J. Biochem., 188:471–480, 1989.
- [131] SEELIG, J.: *Lipid polymorphism, reverse micelles, and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance*. In: LUISI, P.L. und B.E. STRAUB (Herausgeber): *Reverse Micelles*. Plenum Press, New York, 1982.

- [132] FRINGELI, U.P. und H.H. GÜNTARD: *Infrared Membrane Spectroscopy*. In: GRELL, P. (Herausgeber): *Membrane Spectroscopy*. Springer, Berlin, 1981.
- [133] GEISELER, G. und H. SEIDEL: *Die Wasserstoffbrückenbindung*. Vieweg + Sohn, Braunschweig, 1977.
- [134] GRDADOLNIK, J., J. KIDRIČ und D. HADŽI: *Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles and multilayers - an infrared spectroscopic study*. Chem. Phys. Lipids, 59:57–68, 1991.
- [135] ALLINGER, N.L.: *Conformational Analysis. 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing  $V_1$  and  $V_2$  Torsional Terms*. J. Am. Chem. Soc., 99:8127–8134, 1977.
- [136] GUINIER, A.: *La diffraction des rayons X aux très petits angles: application a l'étude de phénomènes ultramicroscopiques*. Ann. Phys.-Paris, 12:161, 1939.
- [137] KRATKY, O., A. SEKORA und R. TREER: *Über die an kolloiden Strukturen unter kleinen Winkeln diffus abgebeugte Röntgenstrahlung*. Z. Elektrochem., 48(11):587–601, 1942.
- [138] GUINIER, A. und G. FOURNET: *Small Angle Scattering of X-rays*. John Wiley & Sons, New York, 1955.
- [139] KRATKY, O.: *Die Welt der vernachlässigten Dimensionen und die Kleinwinkelstreuung der Röntgen-Strahlen und Neutronen an biologischen Makromolekülen*. In: SCHARF, J. (Herausgeber): *Nova Acta Leopoldina*, Band 55. Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle, 1983.
- [140] GLATTER, O. und O. KRATKY: *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press, London, 1982.
- [141] KRATKY, O.: *Größe und Gestalt von Kolloidteilchen und Makromolekülen nach der Röntgen- Kleinwinkelmethode*. Österr. Chem.-Z., 54(13/14):193–202, 1953.
- [142] KRATKY, O. und P. LAGGNER: *X-ray small-angle scattering*. In: *Encyclopedia of Physical Science*, Band 14. 1987.
- [143] KRATKY, O. und K. MÜLLER: *Aggregations and Micellar Structures of Small Molecules in Solution*, Kapitel 15. In: [140], 1982.
- [144] ITRI, R. und L.Q. AMARAL: *Distance Distribution Function of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles by X-ray Scattering*. J. Phys. Chem., 95(1):423–427, 1991.

- [145] ITRI, R. und L.Q. AMARAL: *Small Angle X-ray Scattering of Systems with Inhomogeneous Particles*. J. Appl. Crystallogr., 27:20–24, 1994.
- [146] KRATKY, O.: *Instrumentation, Experimental Technique, Slit Collimation*, Kapitel 3.I. In: [140], 1982.
- [147] O.KRATKY und H. STABINGER: *X-ray small angle camera with block-collimation system an instrument of colloid research*. Colloid Polym. Sci., 262:345–360, 1984.
- [148] STABINGER, H. und O. KRATKY: *A new technique for the measurement of the absolute intensity of x-ray small angle scattering. The moving slit method*. Makromolekul. Chem., 179:1655–1659, 1978.
- [149] MBRAUN GMBH, D-Garching: *Manual for structural components of the OED-Measurement system*, 1989.
- [150] MÜLLER, K.: *Experimental Practice*, Kapitel 7. In: [140], 1982.
- [151] ANTON PAAR GMBH, A-Graz: *PDH - User Instruction Vers 2.1*.
- [152] POROD, G.: *Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. Teil I*. Kolloid-Z. Polym., 124(2):83–114, 1951.
- [153] GLATTER, O.: *Data Treatment*, Kapitel 4. In: [140], 1982.
- [154] ANTON PAAR GMBH, A-Graz: *Program Description ITP-92*.
- [155] GLATTER, O.: *Data evaluation in small angle scattering: Calculation of the radial electron density distribution by means of Indirect Fourier Transformation*. Acta Phys. Austriaca, 47:83–102, 1977.
- [156] GLATTER, O.: *A new method for the evaluation of small-angle scattering data*. J. Appl. Crystallogr., 10:415–421, 1977.
- [157] MOORE, P.B.: *Small angle scattering, Information Content and Error Analysis*. J. Appl. Crystallogr., 13:168–175, 1980.
- [158] SVERGUN, D.I., A.V. SEMENYUK und L.A. FEIGIN: *Small-Angle-Scattering-Data Treatment by the Regularization Method*. Acta Crystallogr. A, 44:244–250, 1988.
- [159] HANSEN, S. und J. SKOV PEDERSEN: *A Comparison of Three Different Methods for Analysing Small-Angle Scattering Data*. J. Appl. Crystallogr., 24:541–548, 1991.

- [160] GLATTER, O.: *Evaluation of Small-Angle Scattering Data from Lamellar and Cylindrical Particles by the Indirect Transformation Method*. J. Appl. Crystallogr., 13:577–584, 1980.
- [161] MÜLLER, K. und O. GLATTER: *Practical Aspects to the Use of Indirect Fourier Transformation Methods*. Makromolekul. Chem., 183:465–479, 1982.
- [162] GLATTER, O.: *The Interpretation of Real-Space Information from Small-Angle Scattering Experiments*. J. Appl. Crystallogr., 12:166–175, 1979.
- [163] GLATTER, O.: *Convolution Square Root of Band-Limited Symmetrical Functions and its Application to Small-Angle Scattering Data*. J. Appl. Crystallogr., 14:101–108, 1981.
- [164] GLATTER, O. und B. HAINISCH: *Improvements in Real-Space Deconvolution of Small-Angle Scattering Data*. J. Appl. Crystallogr., 17:435–441, 1984.
- [165] ANTON PAAR GMBH, A-Graz: *Program Description DEC-92*.
- [166] GLATTER, O.: *Interpretation*, Kapitel 5. In: [140], 1982.
- [167] BERLEPSCH, H. V., R. MITTELBACH, E. HOINKIS und H. SCHNABLEGGER: *Cross-Section Structure of Rodlike Sodium Sulfopropyl Octadecyl Maleate Micelles from Small-Angle Neutron Scattering*. Langmuir, 13:6032–6039, 1997.
- [168] SCHÜTZE, W.: *Diffuse Röntgenkleinwinkelstreuung an kolloidalen Drug Delivery Systemen*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1998.
- [169] MITTELBACH, P.: *Zur Röntgenkleinwinkelstreuung verdünnter kolloider Systeme VIII*. Acta Phys. Austriaca, 19:53–102, 1964.
- [170] SCHÜTZE, W. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Phase Transformation of a Liposomal Dispersion into a Micellar Solution Induced by Drug Loading*. Pharm. Res., 15(4):538–543, 1998.
- [171] BOUWSTRA, J.A., G.S. GOORIS, W. BRAS und H. TALSMA: *Small angle X-ray scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles*. Chem. Phys. Lipids, 64:83–98, 1993.
- [172] SCHUBERT, M.A. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Solubilization of bromhexine hydrochloride in aqueous lecithin dispersions. Physicochemical characterization of interactions between drug and carrier*. Pharmazie, 56(9):734–737, 2001.

- [173] MISHCHENKO, N.I. und A.F. SKRYSHEVSKII: *Interpretation of curves of small-angle scattering by disperse systems of spherical layers*. Sov. Phys. Crystallogr., 27(3):271–273, 1982.
- [174] LAGGNER, P., O. GLATTER, K. MÜLLER, O. KRATKY, G. KOSTNER und A. HOLASEK: *The Lipid Bilayer Structure of the Abnormal Human Plasma Lipoprotein X*. Eur. J. Biochem., 77:165–171, 1977.
- [175] LAGGNER, P.: *Lipoproteins and Membranes*, Kapitel 10. In: [140], 1982.
- [176] RYDHAG, L.: *The Importance of the Phase Behaviour of Phospholipids for Emulsion Stability*. SÖFW, 81(4):168–173, 1979.
- [177] WILCOXON, J.P., S.A. CRAFT und T.R. THURSTON: *Performance of a high-resolution, synchrotron-based, small-angle x-ray scattering instrument*. Rev. Sci. Instrum., 67(9):3021–3034, 1996.
- [178] GLATTER, O. und K. GRUBER: *Indirect Transformation in Reciprocal Space: Desmearing of Small-Angle Scattering Data from Partially Ordered Systems*. J. Appl. Crystallogr., 26:512–518, 1993.
- [179] ALBERG, U., M. FOLGER und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Investigations on the long-term stability of corticosteroids in modified water containing hydrophilic ointment*. Pharm. Pharmacol. Lett., 8:53–56, 1998.
- [180] ALBERG, U. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Einfluss von Ethanol auf die Gebrauchseigenschaften einer O/W-Creme mit mikronisiertem Hydrocortisonacetat*. SÖFW, 125(4):77–83, 1999.
- [181] BERGENSTÅHL, B. und K. FONTELL: *Phase equilibria in the system soybean lecithin/water*. Prog. Coll. Pol. Sci. S, 68:48–52, 1983.
- [182] AVRAMIOTIS, S., V. BEKIARI, P. LIANOS und A. XENAKIS: *Structural and Dynamic Properties of Lecithin-Alcohol Based w/o Microemulsions: A Luminescence Quenching Study*. J. Colloid Interf. Sci., 194:326–331, 1997.
- [183] LINDELL, K., J. ENGBLOM, M. JONSTRÖMER, A. CARLSSON und S. ENGSTRÖM: *Influence of a charged phospholipid on the release pattern of timolol maleate from cubic liquid crystalline phases*. Prog. Coll. Pol. Sci. S, 108:111–118, 1998.
- [184] ROSE, C.: *Stabilitätsbeurteilung von O/W-Cremes auf Basis der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB 1996*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1999.



- [185] HARMS, M. Diplomarbeit, Universität Halle, in Vorbereitung.
- [186] SCHURTENBERGER, P. und C. CAVACO: *The static and dynamic structure factor of polymer-like lecithin reverse micelles*. J. Phys. II France, 4:305–317, 1994.
- [187] GRÖHN, F., B.J. BAUER und E.J. AMIS: *Hydrophobically Modified Dendrimers as Inverse Micelles: Formation of Cylindrical Multidendrimer Nanostructures*. Macromolecules, 34:6701–6707, 2001.
- [188] PILZ, I.: *Proteins*, Kapitel 8. In: [140], 1982.
- [189] MÜLLER, K. und O. GLATTER: *Practical Aspects to the Use of Indirect Fourier Transformation Methods*. Macromol. Chem. Phys., 183:465–479, 1982.
- [190] JANIÁK, M.J., D.M. SMALL und G.G. SHIPLEY: Zitiert aus: [103].
- [191] AKUTSU, H. und T. NAGAMORI: *Conformational Analysis of the Polar Head Group in Phosphatidylcholine Bilayers: A Structural Change Induced by Cations*. Biochemistry-US, 30:4510–4516, 1991.
- [192] FRIEDRICH, I., I. PAPANTONIOU und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Physicochemical characterization of a reverse micellar solution after loading with different drugs*. Pharmazie, 55(10):755–758, 2000.
- [193] KRIWET, K. und C.C. MÜLLER-GOYMANN: *Mutual Interactions between diclofenac diethylamine and phospholipids – investigations on the microstructure of the arisen systems*. Pharmazie, 49(2/3):187–191, 1994.
- [194] MÜLLER-GOYMANN, C.C. und H.J. HAMANN: *Pharmacosomes – Multilamellar Vesicles Consisting of Pure Drug*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 37(2):113–117, 1991.
- [195] WILISCH, I.L.: *Veränderung der kolloidalen Struktur von Lecithinassoziaten bzw. Stratum corneum durch unterschiedliche Ölkomponenten und Fenoprofen im Hinblick auf Arzneistofffreigabe und -permeation durch exzidierte Humanhaut*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1994.
- [196] CORSWANDT, C. V. und O. SÖDERMAN: *Effect of Adding Isopropyl Myristate to Microemulsions Based on Soybean Phosphatidylcholine and Triglycerides*. Langmuir, 14:3506–3511, 1998.
- [197] SILVER, B.: *The Physical Chemistry of Membranes*. In: [103], 1985.
- [198] CORNELL, B.A., J. MIDDLEHURST und F. SEPAROVIC: *Small unilamellar phospholipid vesicles and the theory of membrane formation*. Faraday Disc. Chem. Soc., 81:1–16, 1986.

- [199] ABOOFAZELI, R. und M.J. LAWRENCE: *Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate*. Int. J. Pharm., 93:161–175, 1993.
- [200] CHEN, S.J., D.F. EVANS, B.W. NINHAM, D.J. MITCHELL, E.D. BLUM und S. PICKUP: *Curvature as a determinant of microstructure and microemulsions*. J. Phys. Chem., 90:842–847, 1986.
- [201] CATES, M.E.: *Reptation of Living Polymers: Dynamics of Entangled Polymers in the Presence of Reversible Chain-Scission Reactions*. Macromolecules, 20:2289–2296, 1987.
- [202] ANGELICO, R., A. CEGLIE, U. OLSSON und G. PALAZZO: *Phase Diagram and Phase Properties of the System Lecithin–Water–Cyclohexane*. Langmuir, 16:2124–2132, 2000.
- [203] SHINODA, K., M. ARAKI, A. SADAGHIANI, A. KHAN und B. LINDMAN: *Lecithin-based microemulsions: Phase behaviour and microstructure*. J. Phys. Chem., 95:989–993, 1991.
- [204] BOICELLI, C.A., E. CASALI, M. GIOMINI, A.M. GIULIANI, L. MASOTTI und G. SARTOR: *Interactions of ubiquinones with membrane models*. Ital. J. Biochem., 34(4):250–261, 1985.